

**HISTOLOGISCHE, HISTOCHEMISCHE
UND FEINSTRUKTURELLE UNTERSUCHUNG
DER SCHILDDRÜSE DER JAPANISCHEN WACHTEL
(COTURNIX COTURNIX JAPONICA)**

MATTHIAS RAZ

Disbui. München
1988





Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554823_0061

Aus dem
INSTITUT FÜR TIERANATOMIE DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN
Lehrstuhl für Tieranatomie II
insbesondere allgemeine Anatomie,
Histologie und Embryologie
Vorstand: Prof. Dr. F. Sinowatz

**Histologische, histochemische und feinstrukturelle
Untersuchung der Schilddrüse der Japanischen Wachtel
(*Coturnix coturnix japonica*)**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde der
Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Matthias Raz

aus

Nürnberg

München 1987

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. M. Rüsse

Referent: Prof. Dr. F. Sinowatz

Korreferent: Prof. Dr. H. P. Jennissen

Tag der Promotion: 26. Februar 1988

<u>Inhaltsverzeichnis</u>	Seite
1. Einleitung	1
2. Literaturübersicht	2
2.1. Embryologie	2
2.2. Anatomie	3
2.3. Histologie	5
2.3.1. Schilddrüsenfollikel	5
2.3.1.1. Follikelepithelzellen (Lichtmikroskopie)	6
2.3.1.2. Ultrastruktur der Follikelepithelzellen	8
2.3.2. Kolloid	10
2.3.3. Bindegewebsgerüst	11
2.3.4. Innervation	11
2.3.5. Gefäßsystem	11
2.3.6. Calcitonin-Zellen	12
2.4. Physiologische Grundlagen	14
2.4.1. Hormonsynthese	14
2.4.2. Synthesesteuerung	15
2.4.3. Hormonwirkung	16
2.5. Lektine	16
2.5.1. Definition	16
2.5.2. Geschichte	17
2.5.3. Molekulare Eigenschaften	18
2.5.4. Spezifität	19
2.5.5. Einteilung und Nomenklatur	19
2.5.6. Vorkommen und physiologische Aufgaben	21
2.5.7. Verwendung von Lektinen	22
3. Material und Methodik	24
3.1. Versuchstiere	24
3.2. Organentnahme	24

3.3.	Lichtmikroskopische Methoden	25
3.3.1.	Standardfärbungen	25
3.3.2.	Lektinhistochemie	26
3.3.3.	Immunhistochemie	28
3.4.	Lichtmikroskopie an Semidünnschnitten	29
3.5.	Elektronenmikroskopie an Ultradünnschnitten	29
4.	Ergebnisse	31
4.1.	Makroskopische Befunde	31
4.2.	Befunde anhand der Standardfärbungen	31
4.2.1.	Parenchym	31
4.2.2.	Stroma	32
4.3.	Semidünnschnitte	33
4.4.	Befunde der lektinhistochemischen Untersuchungen	34
4.4.1.	FITC-Lektine	35
4.4.2.	HRP-Lektine	37
4.4.3.	Vergleich zwischen FITC- und HRP-Lektinaffinität	38
4.5.	Befunde der immunhistochemischen Untersuchung	39
4.6.	Elektronenmikroskopische Befunde	39
4.6.1.	Follikelepithelzellen	39
4.6.2.	Interfollikulärer Raum	40
5.	Diskussion	42
6.	Zusammenfassung/Summary	54
7.	Literaturverzeichnis	56
8.	Anhang	
	Abbildungen 1-14	
	Tabellen 1-3	
	Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	
	Danksagung	
	Lebenslauf	

1. Einleitung

Morphologische Untersuchungen an der Schilddrüse sind bereits vor geraumer Zeit bei mindestens 34 verschiedenen Vogelarten durchgeführt worden (FORSYTH 1908). Neuere Ergebnisse, denen histochemische und elektronenmikroskopische Untersuchungsmethoden zugrunde liegen, beschränken sich in zufriedenstellendem Umfang nur auf die Glandula thyroidea des Haushuhns (FUJITA 1963; MAKITA et al. 1966; STOECKEL u. PORTE 1969; BESTETTI et al. 1977; FRENCH u. HODGES 1977; HODGES 1981). In seinem Buch über die Anatomie und Histologie der japanischen Wachtel (*Coturnix coturnix japonica*), die heute als Versuchstier zunehmend an Bedeutung gewinnt, beschreibt FITZGERALD (1969) den histologischen Aufbau der Schilddrüse nur oberflächlich.

Unterschiede in der Schilddrüsenmorphologie bei den einzelnen Vogelarten werden nicht zuletzt in bezug auf das Vorkommen von Zellen verzeichnet, die das Hormon Calcitonin produzieren (HACHMEISTER et al. 1967; STOECKEL u. PORTE 1969; FRENCH u. HODGES 1977; VELICKY et al. 1977). Deshalb erscheint es angebracht, auch die Wachtelthyroidea auf das Vorhandensein oder Fehlen von Calcitonin-Zellen zu überprüfen.

Markierte Lektine haben in den letzten Jahren für die Histologie und die Histopathologie an Bedeutung gewonnen. Sie stellen eine Möglichkeit dar, Kohlenhydrate im Gewebe zu identifizieren und dadurch Zellen und Zellstrukturen zu differenzieren.

Die eigenen morphologischen Untersuchungen an der Schilddrüse der japanischen Wachtel sollen einen Beitrag zur Kenntnis des Feinbaus dieses Organs liefern, den Vergleich zu anderen Vogelarten, die bereits untersucht worden sind, herstellen und das funktionelle Verständnis ergänzen.

2. Literaturübersicht

2.1. Embryologie

Die Zellen des Schilddrüsenparenchyms sind entodermalen Ursprungs (NODEN u. DE LAHUNTA 1985). Beim Hühnerembryo erscheint die Anlage der Glandula thyroidea nach einer Bebrütungsdauer von ungefähr 50 bis 55 Stunden als unpaare Epithelausstülpung des Schlunddarmes an dessen Ventralseite in Höhe der ersten und zweiten Schlundtasche (ANDERSEN 1965; MATHEWS 1972; PATTEN u. CARLSON 1974). Dieser Epithelzapfen nimmt während des Wachstums becherförmige Gestalt an, wird zweilappig und steht mit der Schlundwand nur noch über einen schlanken Stiel in Verbindung. Er reißt am fünften Entwicklungstag ab; die Lappen trennen sich voneinander und wandern als halbmondförmige Gebilde nach lateral (ROMANOFF 1960).

Aus der Wand der sechsten Schlundtasche bilden sich die beiden Ultimobranchialkörper (DUDLEY 1942). Für das Huhn ist bereits der Beweis erbracht, daß sich die Calcitoninzellen in ihnen sekundär ansiedeln. Sie stammen ursprünglich von der Neuralleiste (LE DOUARIN et al. 1974).

Wenn die Primordialzellen der Schilddrüse nach kaudal wandern, kommt es zum Anschluß an den ventralen Teil der letzten Schlundtaschen (ASSEN-MACHER 1973; NODEN u. DE LAHUNTA 1985); dabei werden bei den Säugetieren die Calcitonin produzierenden Zellen in die Schilddrüse inkorporiert, wogegen bei Vögeln und anderen niederen Wirbeltieren die Ultimobranchialkörper als räumlich eigenständige Organe persistieren (PATTEN u. CARLSON 1974).

Am siebten Bebrütungstag kann die Thyroidea des Hühnerembryos bereits Jod, das aus dem Dotter stammt, speichern. Am neunten Tag, also nachdem die Vaskularisation der Schilddrüse stattgefunden hat, erscheint Jod in

konzentrierter Form in der embryonalen Glandula thyroidea; das aufgenommene Jod wird an Eiweiß gebunden, und es werden Kolloidtröpfchen sichtbar (WENTWORTH u. RINGER 1986).

Wenn die Kolloidsekretion in den extrazellulären Raum beginnt, wird das Epithel, das zuvor in bandartigen Reihen angeordnet war, zur Peripherie hin verschoben; dadurch formen sich kugelartige Vesikel, die Schilddrüsen-follikel (HILFER 1979; WENTWORTH u. RINGER 1986).

Ab dem elften Tag wird das Organ durch Thyrotropin stimuliert (MESS u. STRAZNICKY 1970). Zu diesem Zeitpunkt ist die Schilddrüse des Hühnerembryos funktionsfähig und sezerniert Thyroxin (HANSBOROUGH u. KHAN 1951; STOLL u. BLANQUET 1953).

Vor dem Schlüpfen steigt die Aktivität der Thyroidea, so daß am Schlupftag das Serum die höchste Trijodthyronin- und Thyroxinkonzentration aufweist (ROGLER et al. 1959; SPIERS 1980; MCNABB et al. 1981; CHRISTENSEN et al. 1982). Während die Eischale aufgepickt wird, ist eine rasche Zunahme der Wärmeproduktion zu verzeichnen (DECUYPERE et al. 1979). Nach dem Schlüpfen sinkt der Spiegel beider Schilddrüsenhormone bis auf die Konzentration von adulten Vögeln (WENTWORTH u. RINGER 1986).

2.2. Anatomie



Die Schilddrüse des Geflügels ist meistens paarig angelegt; jedoch fehlt bei 15% der männlichen und 25% der weiblichen japanischen Wachteln die linke Drüse. Beim unilateral vorkommenden Organ ergeben sich keine histologisch erkennbaren Abweichungen, obwohl es schwerer ist, als das mittlere Gewicht der bilateralen Drüsen. Wachteln mit einer Hemiagenesis ihrer Schilddrüse verhalten sich klinisch unauffällig (WIGHT 1986).

Die beiden eiförmigen, infolge starker Vaskularisation dunkelroten, glänzenden Organe liegen, in Fettgewebe und lockeres Bindegewebe eingebettet,

ungefähr auf gleicher Höhe beiderseits der Luftröhre am Brusteingang (FORSYTH 1908). Im Gegensatz zu den Säugern besteht kein Kontakt zur Trachea und es gibt auch keinen Isthmus, der das paarige Organ verbindet (FITZGERALD 1969). Somit bleibt an der medialen Seite der Schilddrüse noch Platz für die Vena jugularis; kranial liegt der Ursprung von Arteria carotis communis und Arteria subclavia, die ihrerseits aus der Arteria brachiocephalica hervorgehen (KING u. MCLELLAND 1984; WENTWORTH u. RINGER 1986).

Beide Drüsen sind meistens gleich groß; trotzdem können Differenzen in ihren Abmessungen vorkommen (FORSYTH 1908). Ihre Größe wird von Faktoren wie Alter, Geschlecht, Klima, Futter und Aktivität beeinflusst (KÜCHLER 1935; RINGER 1976). Die durchschnittliche Länge der Wachtelschilddrüse beträgt 2 mm und ihre Breite 0.5 mm (FITZGERALD 1969). Ihre gedachte Längsachse verläuft in kraniokaudaler Richtung (HODGES 1981).

In der engeren Nachbarschaft des kaudalen Pols liegen jeweils Parathyroidea III und IV, der Ultimobranchialkörper, das Paraganglion caroticum, das Ganglion nodosum sive thoracicum des Nervus vagus, Thymuslappchen und der Nervus vagus, der die Vena jugularis begleitet; ihre Anordnung zueinander variiert stark unter den einzelnen Vogelarten (RAETHER 1964; ABDEL-MAGIED u. KING 1978).

Die Blutversorgung wird von den kranialen und kaudalen Schilddrüsenarterien gewährleistet, deren Verzweigungen am kranialen und kaudalen Pol in die Drüse eindringen. Bei der japanischen Wachtel stammen die kranialen Schilddrüsenarterien am häufigsten von der Arteria oesophagea ascendens, die ihrerseits aus der Arteria vertebralis hervorgeht, während die kaudale Schilddrüsenarterie direkt von der Arteria carotis communis abzweigt. Gelegentlich kommt es vor, daß sowohl die kranialen als auch kaudalen Schilddrüsenarterien aus der Arteria oesophagea ascendens entlassen werden. Recht selten entspringen die Schilddrüsenarterien ausschließlich

der Arteria comes nervi vagi und der Arteria oesophagea ascendens.

Der Abfluß des venösen Blutes erfolgt über eine kraniale und kaudale Vene sowie über drei oder vier kurze Schilddrüsenvenen in die Vena jugularis (MIKAMI u. MIYASAKA 1983).

Es gibt auch ein fein verzweigtes Lymphgefäßsystem, das das Organ mit den Schilddrüsenvenen verläßt (ASTIER 1980).

Die größte Beteiligung an der Innervation der Glandula thyroidea obliegt dem Nervus vagus; er entläßt Rami glandulares kranial seines Ganglion nodosum (WATANABE 1960; MAKITA et al. 1966), aus dem Bereich des Ganglion selbst (COHEN et al. 1970; BAUMEL 1975) oder aus dem Nervus recurrens (SSINELNIKOW 1928), die allein oder mit den Blutgefäßen an die Drüse herantreten (HODGES 1981).

Die sympathische Komponente ist von geringem Ausmaß; sie wird entweder vom perivaskulären Nervengeflecht der Arteria carotis communis über die Schilddrüsenarterien an das Organ herangeführt (MAKITA et al. 1966) oder von Nerven entlassen, die mit der Arteria vertebralis in Verbindung stehen (MALINOVSKY 1962).

Im übrigen ergeben detaillierte Untersuchungen über die Innervation starke inter- und intraspezifische Unterschiede (HODGES 1981).

2.3. Histologie

2.3.1. Schilddrüsenfollikel

Die Schilddrüsenfollikel sind die charakteristischen Baueinheiten der Schilddrüsen (JUNQUEIRA u. CARNEIRO 1986). Diese bläschenförmigen Gebilde sind runde oder ovale Hohlräume und in sich als Ganzes geschlossen; sie enthalten das Schilddrüsenkolloid und werden, je nach Funktionszustand, von einem einschichtig platten bis hochprismatischen Epithel begrenzt (FRITSCHI 1926; FITZGERALD 1969; FEDER 1971).

Die Glandula thyroidea ist demnach eine alveoläre Drüse ohne Ausführungsgang und läßt sich in die Drüsen des endokrinen Systems einreihen (FRITSCHI 1926).

Die Follikelgröße hängt wesentlich vom Funktionszustand des Organs ab. In Embryonen und während der ersten Lebenswochen findet man nur kleine, runde Follikel mit einem Durchmesser von 10 bis 15 μm , die iso- oder hochprismatische Zellen begrenzen, da es sich um aktiv sezernierende Drüsen handelt; während des Wachstums werden auch die Follikel immer größer – etwa 40 bis 50 μm – und bei adulten Vögeln sind die Drüsenbläschen unterschiedlich groß, wobei kleine Randfollikel die zahlreichen zentral gelegenen großen Follikel umgeben (ASTIER 1980).

Im Ruhezustand, der beispielsweise während langer Lichtperioden und/oder bei hohen Umgebungstemperaturen vorkommt, weisen Schilddrüsen weite Follikel auf, die infolge der Kolloidanhäufung gedehnt sind. Dabei verlieren die Epithelzellen an Höhe und nehmen fast schuppenartige Gestalt an (VELICKY et al. 1977; OISHI u. KONISHI 1978; HODGES 1981).

Sogenannte Riesenfollikel gibt es bei verschiedenen Vogelarten; in drei Monate alten Hühnchen werden im Drüsenzentrum sechs Riesenfollikel erfaßt, wogegen in zwei Jahre alten Tieren nur ein Riesenfollikel im Randbezirk des Organs feststellbar ist (TSUTSUI 1958).

2.3.1.1. Follikelepithelzellen (Lichtmikroskopie)

Die Gestalt des Zellkerns paßt sich der Zellform an; so erscheint er im hochprismatischen Epithel oval, während er in platten Epithelzellen eine abgeflachte Form annimmt (HODGES 1981). Er enthält einen oder mehrere Nukleoli (VELICKY et al. 1977).

Die Höhe der Zellen wächst mit der sekretorischen Aktivität und nimmt bei Inaktivität ab.

Ihre Vesikel sind von zweierlei Art; sogenannte helle Vesikel, die sich

schwach oder überhaupt nicht mit Methylgrün oder Säurefuchsin anfärben lassen, und sogenannte dunkle Vesikel, die sich intensiv grün färben und häufig mit einem hellen Ring umgeben sind. Zahlenmäßig dominieren die hellen Vesikel; beide Arten können aber in einer Zelle vorkommen, beide können groß oder klein sein und beide Typen werden ins Kolloid freigesetzt (PAYNE 1957). In Paraffinschnitten, die mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt sind, bleiben diese Strukturen farblos, wobei sie jedoch eine schwache Opaleszenz aufweisen, oder sie färben sich blaß mit Eosin. Sie reagieren negativ bei der Untersuchung auf Mukopolysaccharide, mit Ausnahme vereinzelter Zellen, in denen sie eine schwach positive Reaktion zeigen.

Viele Epithelabschnitte werden buchstäblich von diesen Vakuolen ausgefüllt. In einigen Fällen kann man sehen, wie sie von der Zellspitze ins Kolloid übertreten. Im Zytoplasma, das schwach basophil reagiert, gibt es außerdem feine dunkle Granula (VELICKY et al. 1977; HODGES 1981).

Bei Fasanenhennen (*Phasianus colchicus* L.), deren Schilddrüsen im Winter entnommen worden sind, fallen im basalen Zellbereich lange Filamente bzw. rutenartige Strukturen auf, die besonders mit Heidenhains oder Mayers Hämatoxylin sichtbar werden (VELICKY et al. 1977). Weiterhin offenbaren licht- und elektronenmikroskopische Beobachtungen an Schilddrüsenzellen männlicher Hühnchen und Ratten eine Anzahl nadelartiger, kristalloider Einschlüsse von ca. 6 bis 7 μm Länge. Diese Kristalloide färben sich mit Heidenhains Eisenhämatoxylin dunkel an und sind stark PAS-positiv. Die Gestalt und Verteilung des kristalloiden Materials kann von spezifischen Hormonen, vor allem schilddrüsenaktiven Substanzen, beeinflusst werden. Es liegt die Vermutung nahe, daß es sich um eine Abart von Kolloidtröpfchen handelt (YOSHIMURA u. IRIE 1961).

2.3.1.2. Ultrastruktur der Follikelepithelzellen

Die Schilddrüsenfollikel werden vollständig von einer Basalmembran umschlossen. Diese ist kontinuierlich 50 nm breit und von mäßiger Dichte. Sie liegt der Follikelzellbasis eng an und zieht ohne Unterbrechung über die Zellgrenze zur Nachbarzelle.

Je nach Funktionszustand mißt die Zellbreite 6 bis 12 μm und die Zellhöhe 2 bis 7 μm .

Die Zellmembran der Follikelepithelzelle ist etwa 7 nm dick und weist die charakteristische Dreischichtigkeit auf. Von der apikalen Membran ragen Mikrovilli in das Kolloid hinein; in aktiven Drüsen sind sie besonders groß und zahlreich.

In allen Altersklassen gibt es vereinzelt Epithelzellen mit Zilien, von denen aber meist nur das Basalkörperchen zu sehen ist. Welchem Zweck diese Zilien dienen, ist noch unklar.

Die lateralen Plasmamembranen aneinandergrenzender Follikelzellen verfügen im apikalen Bereich über Kontaktstellen, bestehend aus einer Zonula occludens (tight junction), Zonula adhaerens (intermediary junction) und einer Macula adhaerens (Desmosom); bei Tauben (MURAMOTO 1964) und bei Hühnern sind diese Desmosomen aber nicht so gut ausgeprägt und auch nicht so zahlreich wie bei den Säugetieren.

Benachbarte laterale Zellmembranen verlaufen meist geradlinig parallel mit einem Abstand von 20 nm. Im basalen Bereich treten Verzahnungen zwischen Nachbarzellen auf.

Die Mitochondrien, rund bis oval bei jungen Vögeln, werden im Laufe des Alters länglich; sie liegen sehr nahe am rauen endoplasmatischen Retikulum, das sehr gut ausgeprägt ist und sich auf die basale Zelhälfte beschränkt.

Zahlreiche freie Ribosomen verteilen sich unregelmäßig über das gesamte Zytoplasma.

Der Golgi-Komplex liegt supra- und paranukleär; er besteht aus 60 bis 200 nm großen Vesikeln, die traubenartig angeordnet sind. Die meisten von ihnen besitzen eine einfache Membran, einige sind jedoch mit Fibrillen ("Borsten") versehen.

Zwischen dem endoplasmatischen Retikulum und dem Golgi-Komplex kommen viele kleine Vesikel mit einem Durchmesser von 50 bis 100 nm vor; sie werden durch "budding" vom endoplasmatischen Retikulum gebildet. Bei Hühnern gibt es im apikalen Zellbereich zwei Arten membranumschlossener, bläschenartiger Körper - Vesikel: dichte Körper mit einem Durchmesser von 0,4 bis 2,0 μm und helle Körper mit einem Durchmesser von 0,4 bis 2,5 μm . Letztere können sich sogar an der apikalen Membran zum Follikellumen hin öffnen.

Darüber hinaus können im apikalen Zellbereich kleinere elektronendichte Granula mit einem hellen Hof und einem Durchmesser von 100 bis 500 nm festgestellt werden; es handelt sich wahrscheinlich um Primärlysosomen. Granula, die größer als 500 nm sind, in ihrer Dichte aber den Primärlysosomen ähneln, betrachtet man als Sekundärlysosomen, die durch Verschmelzung von Primärlysosomen mit Kolloidtröpfchen entstehen. Die restlichen Körperchen, sogenannte "residual bodies", sind kleiner und dichter als Sekundärlysosomen und werden hauptsächlich lateral im apikalen Zellbereich beobachtet (FRENCH u. HODGES 1977; ASTIER 1980).

Durch Beifütterung von Thiouracil wird die Funktion der Follikel epithelzellen der Schilddrüse aktiviert; dies beweist das hochprismatische Epithel mit zahlreichen Mikrovilli, großen Mitochondrien, gut entwickeltem endoplasmatischem Retikulum und Golgi-Komplex (EMURA et al. 1977).

Die Schilddrüsenhormonsynthese stellt man sich angesichts der morphologischen Gegebenheiten folgendermaßen vor:

Im rauen endoplasmatischen Retikulum erfolgt die Produktion von Protein, welches in den Golgi-Komplex übergeführt wird; dessen Vesikel setzen das

Thyroglobulin mittels merokriner Sekretion ins Follikellumen frei (KUROSUMI 1961; FUJITA 1963). Man vermutet, daß die Jodierung des Thyroglobulins an der apikalen Zelloberfläche erfolgt (FUJITA 1975). Kolloidtröpfchen werden mittels Endozytose aus dem Follikellumen in das apikale Zytoplasma reabsorbiert und verschmelzen mit den Primärlisosomen zu Sekundärlisosomen, in denen die enzymatische Hydrolyse des Thyroglobulins stattfindet. Das dabei entstandene Thyroxin und Trijodthyronin diffundiert beim Vogel offenbar nur im apikalen Zellbereich durch die laterale Zellwand, so daß es vom Interzellularspalt aus in die Kapillaren gelangt. Tatsache ist, daß die Follikelzellen keinen morphologisch nachweisbaren Sekretionsapparat besitzen, der an der Zellbasis Produkte freisetzt. Die Sekundärlisosomen werden nach der Hormonfreisetzung kleiner und dichter und verbleiben als "residual bodies" (FUJITA 1975, FRENCH u. HODGES 1977; ASTIER 1980).

2.3.2. Kolloid

Das Produkt der Follikelepithelzellen ist das Schilddrüsenkolloid, als homogene, strukturlose Masse füllt es die Follikelhöhle aus (FRITSCHI 1926).

Bei jungen Vögeln im Alter von 5 bis 25 Tagen färbt sich das Kolloid mit dem basischen Methylgrün; mit zunehmendem Alter nimmt es jedoch in den zentral gelegenen Follikeln den sauren Farbstoff Säurefuchsin besser an.

In den Randfollikeln, wo die Zellhöhe uneinheitlich ist, variiert auch das Färbeverhalten des Kolloids. Je nach Grad der sekretorischen Aktivität kann es sich mit dem basischen oder sauren Farbstoff anfärben. In einigen Randfollikeln kommt es vor, daß sich die Kolloidmitte sauer färbt, während ein ringförmiger Bereich, der den apikalen Zellsaum berührt, den basischen Farbstoff annimmt. Diese Tatsachen weisen auf chemische Unterschiede in den beiden Kolloidzonen hin (PAYNE 1957).

2.3.3. Bindegewebsgerüst

Die Drüse wird von einer gleichmäßig dünnen Bindegewebskapsel umschlossen (FEDER 1971; HODGES 1981), in der kollagene und elastische Fasern, Bindegewebszellen – insbesondere Mastzellen und Plasmazellen – und stellenweise eosinophile Granulozyten vorkommen. Eine große Anzahl Arteriolen, Venolen und Kapillaren sind, ebenso wie Nerven und Fettgewebe, Bestandteile der Kapsel (MAKITA et al.1966; VELICKY et al.1977). Feine Bindegewebszüge (Trabekel), die von der Kapselinnenseite ausgehen, ziehen ins Organinnere und unterteilen es in Kompartimente; jedes Kompartiment enthält einen Follikel (FORSYTH 1908). Bei der japanischen Wachtel unterteilen diese Trabekel die Drüse in zusammenhängende Läppchen (FITZGERALD 1969). Die Follikel liegen grundsätzlich sehr eng aneinander, da das interfollikuläre Bindegewebsgerüst, wie eben erwähnt, nur spärlich ausgebildet ist (FORSYTH 1908); es besteht aus wenigen feinen kollagenen Fasern, Fibroblasten und Blutkapillaren (HODGES 1981), und es gibt keine elastischen Fasern, außer in Begleitung von Gefäßen (SCHESCHIN 1925).

2.3.4. Innervation

Im Kapselbindegewebe liegen viele kleine Nervenbündel. Feine perifollikuläre Nerven und dickere afferente Fasern ziehen um die Follikel herum, an deren Wand große keulenähnliche Endigungen sichtbar gemacht werden können (MAKITA et al.1966).

2.3.5. Gefäßsystem

Die kleinen Arterien, die am kranialen und kaudalen Pol in die Schilddrüse eindringen, verzweigen sich wiederholt und ziehen als Arteriolen und schließlich als Kapillaren durch das interfollikuläre Bindegewebe. Sie

ordnen sich zu einem Kapillarnetz, das jeden Follikel umhüllt. Diese Kapillaren besitzen einen ziemlich großen Durchmesser und werden deshalb zur Gruppe der sinusoiden Kapillaren gerechnet. Der interfollikuläre Gefäßplexus wird von einem System dünnwandiger Venen auf der Drüsenoberfläche drainiert (MIKAMI u. MIYASAKA 1983).

Sowohl das Gefäßendothel als auch das Follikel­epithel besitzen eine Basalmembran; dazwischen können gelegentlich Perizyten auftreten.

Der Gefäßdurchmesser beträgt 4 bis 11 μm . Das Kapillarlumen wird von ein bis vier Endothelzellen umschlossen. Das auffälligste Merkmal dieses Zelltyps sind Zytoplasmafortsätze, die ins Kapillarlumen hineinragen. Ferner wird die Endothelzelle von Fenstern durchbrochen, die mittels Diaphragma verschlossen sind; sie kommen auch an den Zytoplasmafortsätzen vor (BESTETTI et al. 1977). Die lichte Weite dieser Endothelfenster beträgt 25 bis 50 nm; man findet sie hauptsächlich dort, wo Pinozytosevesikel in den Endothelzellen eingeschlossen sind (FRENCH u. HODGES 1977).

2.3.6. Calcitonin-Zellen

Der dominierende Zelltyp in den Ultimobranchialkörpern ist die Calcitonin-Zelle, kurz C-Zelle genannt. Sie synthetisiert das Polypeptidhormon Calcitonin, welches den Calciumspiegel im Blut senkt.

Bei erwachsenen Säugetieren ist das Gewebe der Ultimobranchialkörper völlig in die Schilddrüse integriert, so daß sie dort als die sogenannten parafollikulären Zellen vorgefunden werden. Diesbezüglich weicht aber die Entwicklungsgeschichte der Vögel von der der Säuger ab, indem bei den meisten Vogelarten die Ultimobranchialkörper zeitlebens von der Schilddrüse räumlich getrennt bleiben (ASSEMmacher 1973).

Als Ausnahme gilt bisher nur die Taube, bei der eine partielle Einverleibung ultimobranchialen Gewebes in die Schilddrüse erwiesen ist (MATTHEWS et

al.1968; STOECKEL u. PORTE 1969). So werden mit dem Elektronenmikroskop bei *Columba livia* und *Streptopelia decaocto* Gruppen oder sogar größere Anhäufungen von Ultimobranchialzellen in der unmittelbaren Umgebung der Schilddrüse beobachtet. Davon durchdringen Zellstränge die Bindegewebskapsel und können in das Interstitium zwischen den Schilddrüsenfollikeln vordringen, wobei sie Gefäße und Nervenfasern begleiten; sie werden immer von einer eigenen Basalmembran begrenzt, die nicht mit der der Schilddrüsenfollikel identisch ist. Vergleichsweise sind wenig C-Zellen in die Follikelwand integriert.

Charakteristisch für diesen Zelltyp sind dichte polymorphe Granula, die einen Durchmesser von 200 bis 300 nm aufweisen. Ferner gibt es zahlreiche Mitochondrien, deutliche Golgi-Komplexe und ein gut entwickeltes Ergastoplasma (STOECKEL u. PORTE 1969; ASSENMACHER 1973).

Histologische Schilddrüsenuntersuchungen bei *Phasianus colchicus* L. weisen darauf hin, daß wahrscheinlich auch beim Fasan parafollikuläre Zellen vorkommen. Sie sind größer als Follikelepithelzellen, färben sich intensiv sowohl mit Azurblau als auch mit Toluidinblau und kommen in der Nachbarschaft oder direkt in der Wand von Randfollikeln vor. Mit dem Elektronenmikroskop erkennt man dunkle, rundliche Granula mit einer Größe bis zu 190 nm (Velicky et al.1977).

Das Fehlen von Calcitonin-Zellen in Hühnerschilddrüsen und ihr Vorkommen in Ultimobranchialkörpern wird durch eine Arbeit bestätigt, die als histochemisches Kriterium die Aufnahme und Dekarboxylierung von 5-Hydroxytryptophan zugrundelegt; gespeicherte Monoamine sind dabei fluoreszenzmikroskopisch lokalisierbar (HACHMEISTER et al.1967).

Die intraperitoneale Injektion eines Extraktes aus Hühnerschilddrüsen verursacht bei Ratten kein signifikantes Absinken des Plasma-Calcium-Spiegels im Gegensatz zu Schweineschilddrüsenextrakt (KRAINTZ u. PUIL 1967).

Die Granula der C-Zellen von Säugern enthalten Calcitonin, Somatostatin, Serotonin und Dopamin (JUNQUEIRA u. CARNEIRO 1986). Anhand von Schilddrüsen der Rasse Weißes Leghorn ist immunhistochemisch mittels Calcitonin-Antiserum, Peroxidase und Antiperoxidase nachgewiesen, daß keine calcitoninpositiven Zellen in der Thyroidea zu finden sind; dagegen reagiert Gewebe von Ultimobranchialkörpern deutlich positiv.

Untersuchungen über das Vorhandensein von Somatostatin in C-Zellen des Ultimobranchialkörpers von Geflügel, die ebenfalls mit der Immunperoxidase-Methode erfolgen, liefern eindeutig negative Ergebnisse (KAMEDA 1984).

2.4. Physiologische Grundlagen

2.4.1. Hormonsynthese

Die Synthese der Schilddrüsenhormone erfolgt beim Vogel ähnlich wie bei den Säugetieren (WENTWORTH u. RINGER 1986). Jod, das über das Futter aufgenommen wird, zirkuliert als Jodid im Blut. Von dort wird es in die Follikelzellen aktiv an der basalen Zytoplasmamembran mittels Jodidpumpe aufgenommen; das Enzym Peroxidase sorgt dann für die Oxidation des J^- zum elementaren Jod. Im endoplasmatischen Retikulum erfolgt die Proteinsynthese. Über den Golgi-Apparat wird das Glykoprotein in Bläschen verpackt und gelangt durch Exozytose an die apikale Zelloberfläche (JUNQUEIRA u. CARNEIRO 1986). Extrazellulär, also im Follikellumen, entsteht durch Jodierung der Tyrosyl- und Thyroninreste des Eiweißkörpers das Thyreoglobulin; in ihm liegen nun die Schilddrüsenhormone Monojodtyrosin, Dijodtyrosin, Trijodthyronin (T_3) und Tetrajodthyronin (T_4 , Thyroxin) inaktiv vor (FREY u. FLOCK 1958; VLIJM 1958; LAGUE u. VAN TIENHOVEN 1969; GRANDHI u. BROWN 1975).

Das Thyreoglobulin imponiert histologisch als Kolloid und repräsentiert die

Das Thyreoglobulin imponiert histologisch als Kolloid und repräsentiert die extrazelluläre Stapelform der Schilddrüsenhormone (VON MAYERSBACH 1976).

Bei Bedarf nehmen Follikelzellen Kolloid durch Endozytose auf. Im Zytoplasma verschmelzen die kolloidhaltigen Bläschen mit Lysosomen; es entstehen Phagolysosomen. Dort werden die Peptidbindungen zwischen jodierten Resten und dem Thyreoglobulin durch Proteasen gelöst und Monojodtyrosin, Dijodtyrosin, Trijodthyronin und Thyroxin ins Zytoplasma freigesetzt (JUNQUEIRA u. CARNEIRO 1986). Die Tyrosine müssen in jodiertes Thyronin übergeführt werden, damit sie von der Schilddrüse in die Blutbahn entlassen werden können (WENTWORTH u. RINGER 1986).

Beim Vogel werden T_3 und T_4 an Serumalbumin gebunden; es gibt im Gegensatz zum Säuger kein thyroxinbindendes Globulin (TATA u. SHELLABARGER 1959). Die lockere Bindung an Serumprotein begründet, daß es im Gegensatz zum Blut der meisten warmblütigen Wirbeltiere mehr ungebundenes Thyroxin im Vogelblut gibt (REFETTOFF et al. 1970).

2.4.2. Synthesesteuerung

Thyrotropin-Releasing-Hormon (TRH), das im Hypothalamus gebildet wird, stimuliert die Sekretion von Thyrotropin (TSH) aus der Adenohypophyse (MCFARLAND et al. 1966; KANEMATSU u. MIKAMI 1970). Thyrotropin regt seinerseits die Synthese und Abgabe der Schilddrüsenhormone an; diese wirken einerseits an den Erfolgsorganen, andererseits regulieren sie durch negative Rückkoppelung die Abgabe von TRH aus dem Hypothalamus und die Freisetzung von Thyrotropin aus dem Hypophysenvorderlappen (WENTWORTH u. RINGER 1986).

Dieses Regelsystem ist zudem mit Umwelteinflüssen eng verflochten; Kälte erhöht beispielsweise die TSH-Ausschüttung (HENDRICH u. TURNER 1964), wogegen hohe Temperaturen die Schilddrüsenhormonsekretion sen-

ken (MUELLER u. AMEZCUA 1959). Lange Lichtperioden aktivieren anfangs die Schilddrüsentätigkeit, die dann jedoch von der gleichermaßen gesteigerten Steroidsynthese der Gonaden unterdrückt wird (FOLLET u. RILEY 1967).

2.4.3. Hormonwirkung

Die Hormone der Schilddrüse sind für ein normales Wachstum und für die Entwicklung unerlässlich (WENTWORTH u. RINGER 1986). Sie stimulieren den Stoffwechsel; durch ihren Einfluß auf die Produktion körpereigener Wärme sind sie für die Anpassung des Organismus an die Umgebungstemperatur verantwortlich. Eine erhöhte Verfügbarkeit an Schilddrüsenhormonen beschleunigt das Körperwachstum und steigert die Eiproduktion. Auch bei der Mauser spielen sie eine entscheidende Rolle, da sie das Wachstum neuer Federn stimulieren (KING u. MCLELLAND 1984).

Thyreoidektomierte Hähne haben einen verringerten Ruhestoffwechsel; sie erfahren eine Wachstumsverlangsamung, es kommt zu einer Zunahme des Leber- und Fettgewebes und zu einer Abnahme des Kammgewichtes (SNAPIR et al. 1982). Die Federn werden fransig, länglich und blaß, und die Aktivität der Gonaden läßt nach (RINGER 1976).

2.5. Lektine

2.5.1. Definition

Heute werden Lektine als Proteine und Glykoproteine pflanzlichen und auch tierischen Ursprungs verstanden. Sie besitzen die Eigenschaft, sich an spezifische Kohlenhydrate oder Kohlenhydratgruppen reversibel und nicht-kovalent zu binden, ohne dabei den Glykosylliganden zu verändern. Trotz ihres selektiven Verhaltens besteht jedoch keinerlei verwandtschaftliche Beziehung zu Enzymen oder Immunglobulinen (KOCOUREK u. HOREJSI 1983).

2.5.2. Geschichte

Die erste Beschreibung eines Lektins lieferte STILLMARK (1888) an der Universität von Dorpat, einer der ältesten Universitäten im zaristischen Rußland. Er beobachtete bei der Untersuchung des Extraktes aus dem Samen des Wunderbaums - *Ricinus communis* - nicht nur dessen toxische Eigenschaften, sondern auch seine agglutinierende Wirkung auf Erythrozyten. STILLMARK erbrachte ferner den Beweis, daß es sich bei dem Stoff, der für die Agglutination verantwortlich ist, um ein Protein handelt und gab ihm den Namen Ricin.

Kurz danach entdeckte HELLIN (1891) an derselben Universität, daß auch das toxische Extrakt aus dem Samen von *Abrus precatorius* die roten Blutkörperchen verklumpt. Das neue Agglutinin wurde Abrin genannt.

Während der neunziger Jahre des letzten Jahrhunderts offenbarte EHRLICH (1891 u. 1897) mit Abrin und Ricin einige der fundamentalsten Prinzipien der Immunologie. So werden Mäuse bei wiederholter subkutaner Injektion kleiner Ricindosen immun gegen dieses Toxin. Ferner kann das Serum einer immunen Maus die Toxizität des Ricins neutralisieren, dieser Vorgang ist spezifisch, d.h. das "Antiricin", das im Organismus eines Tieres gebildet wird, das mit Ricin immunisiert ist, kann nicht die toxische Wirkung von Abrin neutralisieren und "Anti-Abrin" kann nicht Ricin neutralisieren. So demonstrierte EHRLICH, daß die Immunospezifität mit dem Antiserum zusammenhängt.

Die ersten nicht-toxischen Lektine fanden LANDSTEINER und RAUBITSCHKE (1908), die sie aus den Pflanzen *Phaseolus vulgaris*, *Pisum sativum*, *Lens culinaris* und *Vicia sativa* isolierten.

Sie erkannten auch, daß Lektine speziesspezifisch sind; kleine Mengen Lentil-Lektin agglutinieren Kaninchenerythrozyten, dagegen zeigen sogar hohe Konzentrationen von diesem Lektin keine Wirkung auf Taubenery-

throzyten.

BOYD und REGUERA (1949) entdeckten, daß ein Lektin blutgruppenspezifisch sein kann.

WATKINS und MORGAN (1952) zeigten, daß lektinbedingte Haemagglutination durch Zugabe bestimmter einfacher Zucker verhindert wird.

In der Folgezeit fand man Anti-O-, Anti-A-, Anti-A₁- und Anti-B-Lektine.

Gemäß jener Entdeckung der blutgruppenspezifischen Phythaemagglutinine und der spezifischen Affinität zu bestimmten Zuckerstrukturen prägte BOYD den Namen Lektin, der von dem lateinischen Wort "legere" (=lesen, auswählen) abgeleitet wird (BOYD u. SHAPLEIGH 1954).

2.5.3. Molekulare Eigenschaften

Heute sind über 50 Lektine gereinigt und chemisch charakterisiert. Bei der Prüfung der Aminosäurezusammensetzung, Molekülgröße und anderer molekularer Eigenschaften wird klar, daß allen bekannten Lektinen nur der Proteincharakter gemein ist (SHARON 1977). Dabei handelt es sich zumeist um Glykoproteine, mit Ausnahme von Concanavalin A und WGA, die keine Zuckerreste besitzen und deshalb als Proteine klassifiziert werden (ROTH 1978).

Ein gemeinsames Strukturprinzip, wie es beispielsweise bei Immunglobulinen vorkommt, gibt es hier nicht (PLENDL u. SCHMAHL 1986).

Die Molekülmassen bewegen sich in einer Größenordnung zwischen 26000 (WGA) und 400000 (LBA) g/Mol. Die Angaben für die Masse jedes einzelnen Lektins unterliegen teilweise starken Schwankungen; dies begründet sich darin, daß die meisten Lektine aus zwei oder mehreren (bis zu 18) Untereinheiten bestehen, die Assoziations- und Dissoziationsreaktionen ausgesetzt sind (SHARON u. LIS 1972).

Als Charakteristikum für Lektine kann ihr Gehalt an Metallionen, meist Mn^{2+} oder Ca^{2+} , angesehen werden, die für die zuckerbindenden und agglu-

tinierenden Eigenschaften als unerläßlich gelten (ROTH 1978).

Wegen ihrer molekularen Individualität besitzen alle Lektinmoleküle zwei oder mehrere Kohlenhydratbindungsstellen, die als spezifisch angesehen werden (GALLAGHER 1984).

2.5.4. Spezifität

Damit ein Lektin analytische Verwendung finden kann, muß seine Kohlenhydratbindungsspezifität bekannt sein. Dieses Ziel wird mit der Landsteiner-Hapten-Inhibitionstechnik erreicht; dabei finden freie Monosaccharide oder ihre Alkylglykoside als kompetitive Antagonisten des Lektins Verwendung, durch die die Agglutination von Zellen oder Glykokonjugaten gehemmt wird (LANDSTEINER 1962). Dieses Prinzip ähnelt der Wirkung von Haptenen, kleinen Molekülen, die sich mit bestimmten Antikörpern binden und so die Komplexbildung von Antigen und Antikörper verhindern (SHARON 1977).

Die nicht-kovalente und reversible Bindung des Lektins erfolgt an der nicht-reduzierenden, terminalen Glykosylgruppe von Kohlenhydraten bzw. Glykoproteinen (GOLDSTEIN u. HAYES 1978). Es gibt allerdings auch Lektine, die nur mit spezifischen Kohlenhydratsequenzen, wie etwa Oligosacchariden, reagieren und nicht mit individuellen Zuckern, die in der Sequenz vorkommen (GALLAGHER 1984).

Bei der Bestimmung der Spezifität zeigen nun einige Lektine eine fast ausschließliche Affinität zu Mannose oder Glukose, andere dagegen zu Galaktose. Manche können nicht zwischen α - und β -Anomeren unterscheiden, andere sind wiederum nur zu einem Anomer affin (PLENDL u. SCHMAHL 1986).

2.5.5. Einteilung und Nomenklatur

Die Einteilung der Lektine erfolgt nach ihrer Kohlenhydratspezifität, wobei

sieben große Gruppen unterschieden werden (ROTH 1978; GOLDSTEIN 1981).

Spezifität für

Beispiel

1. D-Mannose und D-Glukose	Con A
2. N-Azetyl-D-Glukosamin	WGA
3. N-Azetyl-D-Galaktosamin	DBA, HPA, LBA, SBA
4. D-Galaktose	MPA, PNA, RCA
5. L-Fukose	UEA
6. Neuraminsäure (sialic acid)	LFA, LPA
7. komplexe Kohlenhydrate	PHA

Eine Abwandlung dieser Einteilung stellt die Klassifizierung der Lektine in zwei Hauptgruppen dar und zwar in Exolektine und Endolektine

Alle Lektine, die zur ersten Gruppe gehören, können von geringen Konzentrationen freier Zucker oder deren Methylglykosiden gehemmt werden. Man bezeichnet sie auch als Exolektine, weil sie sich überdies an externe nicht-reduzierende Kohlenhydrate von komplizierten Sacchariden binden; wenn sie sich dabei sowohl an kettenendständige Zucker aber auch an nicht-endständige (innere) Zucker binden können, heißen sie fakultative Exolektine; ist für die Bindung ein kettenendständiger Zucker zwingend erforderlich, spricht man von obligaten Exolektinen.

Die der zweiten Hauptgruppe zugeordneten Lektine werden nur von spezifischen Kohlenhydratsequenzen potent gehemmt; man spricht dabei auch von Endolektinen, da sie einen oder mehrere Zucker innerhalb der Saccharidkette erkennen müssen, damit eine Bindung zustande kommt (GALLAGHER 1984).

"Bei der Nomenklatur der Lektine wird ihre Herkunft, d.h. ihre biologische Quelle, berücksichtigt, wobei in der Regel der lateinische Name gebraucht,

die allgemein gebräuchliche Abkürzung aber häufig aus dem Englischen übernommen wird" (PLENDL u. SCHMAHL 1986).

Beispiele:

Benennung (Abkürzung) und Herkunft	Spezifität
Limulus polyphemus Agglutinin (LPA) Pfeilschwanzkrebs	Neuraminsäure
Arachis hypogaea Agglutinin (PNA) Erdnuß (englisch: peanut)	D-Galaktose
Canavalia ensiformis Agglutinin (Con A) Schwertbohne	D-Glukose, D-Mannose

(GOLDSTEIN 1981; BROWN u. HUNT 1978)

2.5.6. Vorkommen und physiologische Aufgaben

Lektine kommen nicht nur in Pflanzen und deren Samen vor, sondern auch in Bakterien, Invertebraten und Vertebraten (KOCH u. UHLENBRUCK 1982).

Obwohl in der Mehrheit der Fälle die Aufgaben der Lektine unbekannt sind, werden ihnen Schutzfunktionen und die Beteiligung an einigen wichtigen zellulären Entwicklungsprozessen in Pflanzen und Tieren zugesprochen.

Es liegt die Vermutung nahe, daß WGA (wheat germ agglutinin) den Weizen während des Auskeimens vor Pilzen und anderen chitinhaltigen Pflanzenpathogenen schützt; WGA hemmt nämlich das Wachstum bestimmter Pilze,

die in ihren Zellwänden Chitin - ein Polymer des N-Azetylglukosamins - enthalten (SHARON 1977). Ferner ist der Nachweis erbracht, daß Lektine die stickstofffixierenden Bakterien an die Wurzelhaare von Leguminosen binden und damit eine Symbiose ermöglichen (Goldstein 1980).

Avertebraten-Lektin wird meist in der Haemolymphe gefunden, wo es - von Haemozyten sezerniert - eine unspezifische, immunologische Schutzfunktion erfüllt; sie agglutinieren eingedrungene pathogene Mikroorganismen, die dann an Haemozyten angeheftet werden, wo sie zerstört und durch Phagozytose eliminiert werden. Bei den Gastropoda schützen Lektine die befruchteten Eier vor bakteriellen Infektionen. *Entamoeba histolytica* produziert Lektine mit toxischer Wirkung auf den Wirtsorganismus (KOCH u. UHLENBRUCK 1982).

2.5.7. Verwendung von Lektinen

Biologische Membranen bestehen aus einer Lipiddoppelschicht, in die Proteine und Glykoproteine eingelagert sind, Kohlenhydratseitenketten solcher Membranproteine liegen ausschließlich auf der Membranaußenseite (MARTIN 1986). Diesen Kohlenhydratkomponenten wird die Funktion von Zellrezeptoren zugeschrieben, die beispielsweise Informationen für Wachstum und Differenzierungsprozesse empfangen (WIESER u. BRUNNER 1983; REUTTER 1984) oder auch bei der malignen Transformation eine Rolle spielen (SHARON 1982).

Neben einer breitgefächerten Anwendung der Lektine bei chemischen und biologischen Analysen, wie etwa der Blutgruppentypisierung, der Isolierung und Reinigung kohlenhydrathaltiger Moleküle, der Verwendung in der Tumorforschung und vielem mehr (GOLDSTEIN 1980), lassen sie sich auch an Gewebeschnitten einsetzen. Die Analyse spezifischer Mono- und Oligosaccharide in Membranen stellt dabei einen wichtigen Bereich histo- und zytochemischer Untersuchungen dar.

Zur Sichtbarmachung der Interaktion zwischen zelleigenem Kohlenhydrat und angelagertem Lektin bedarf es einer vorangehenden Konjugation des Lektins mit einer Markierungssubstanz.

Quantitative Analysen werden durch die Ankopplung von Radioisotopen an Lektinen möglich. Sie geben nicht nur Aufschluß über die Zahl der Lektinbindungsstellen an Membranen, sondern auch über die Stärke der Bindung; mit elektronenmikroskopischen Aufnahmen kann außerdem die Lokalisation der Bindungsstellen genau sichtbar gemacht werden.

Die Markierung der Lektine mittels Fluoreszin oder Rhodamin ermöglicht die lichtmikroskopische Darstellung der zelleigenen Kohlenhydrate.

Schwermetallverbindungen, wie Ferritin oder Gold, die mit Lektinen konjugiert sind, haben vor allem in der elektronenmikroskopischen Sichtbarmachung der Lektinbindungsstellen Eingang gefunden (ROTH 1978).

3. Material und Methodik

3.1. Versuchstiere

Aus der Versuchstierzucht des Institutes für Physiologie, physiologische Chemie und Ernährungsphysiologie der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München wurden 10 männliche und 10 weibliche japanische Wachteln (*Coturnix coturnix japonica*) zur Verfügung gestellt. Die drei Monate alten Tiere waren klinisch gesund. Sie wurden bei Zimmertemperatur unter Tag- und Nachtbeleuchtung in geräumigen Sammelkäfigen gehalten, wobei ihnen die Futter- und Wasseraufnahme nach Belieben möglich war.

3.2. Organentnahme

Zunächst erfolgte zur Hemmung der Blutgerinnung, als Voraussetzung für die ungehinderte Gefäßperfusion, eine intramuskuläre Injektion von 0,5 ml einer Heparin-Natrium-Lösung (Liquemin^R) in die Brustmuskulatur. Eine Stunde später wurden die Tiere, ebenfalls durch intramuskuläre Injektion, mit je 1 ml des Barbiturat-Narkotikums Narkoren^R betäubt bzw. euthanasiert.

Zur Freilegung der Schilddrüsen mußten die Wachteln in Rückenlage verbracht werden. Nach Durchtrennung der äußeren Haut in der Medianen vom Hals bis zum kaudalen Ende der Crista sterni wurden beiderseits der Musculus pectoralis und der Musculus coracobrachialis entfernt. Die Entartikulation des Schultergelenks und die Abtrennung der Rippen vom Brustbein ermöglichte die Wegnahme des Sternums samt Clavicula und Coracoideum (BAUMEL 1979); damit war ein freier Zugang zu den Schilddrüsen und auch zum Herzen geschaffen.

Für die lichtmikroskopischen Untersuchungen wurden die Schilddrüsen von 16 Wachteln und einer Ratte aus ihrer Umgebung herauspräpariert, für 24 Stunden in Bouin'scher Lösung fixiert, über eine aufsteigende Alkoholreihe und Xylol dehydriert und in Paraplast eingebettet.

Für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen erfolgte eine Perfusion der Schilddrüsen. Zu diesem Zweck wurde bei vier Wachteln die Herzspitze mittels Scherenschlag eröffnet und in die linke Herzkammer eine flexible Kunststoffkanüle vom Kaliber 0,9 mm eingeführt, die mit einer Klemme gesichert wurde. Den Abfluß der Perfusionsflüssigkeit gewährleistete der eröffnete rechte Herzvorhof. Die Vorspülung des Gefäßsystems erfolgte mit 40 ml physiologischer Kochsalzlösung unter mäßigem Druck. Die Perfusionfixierung wurde anschließend mit dreiprozentiger Glutaraldehydlösung (GAH) durchgeführt. Der Entnahme von Schilddrüsen Gewebe folgte die Zerkleinerung des Organs in kleine Blöcke von 1 mm Seitenlänge mittels scharfer Rasierklingen. Die Nachfixierung fand für vier Stunden in Glutaraldehyd statt. Nach Waschen der Proben in Natriumcacodylatpuffer (0,15 mol; pH 7,3) wurden sie über eine aufsteigende Alkoholreihe dehydriert und über Propylenoxid in Araldit eingebettet.

3.3. Lichtmikroskopische Methoden

Von den in Paraplast eingebetteten Schilddrüsen wurden 5 µm dicke Schnitte mit einem Leitz-Rotationsmikrotom angefertigt und folgenden Färbungen unterzogen:

3.3.1. Standardfärbungen

Hämalaun-Eosin; Trichromfärbung nach Masson und Goldner; Azanfärbung nach Heidenhain; Feulgen'sche Nuklealreaktion; Nachweis saurer Mukopolysaccharide mit der Alzianblau-8-GS-Methode; Perjodsäure-Schiff-Reaktion

(PAS-Reaktion); Silberimprägnation nach Bodian (Methoden nach ROMEIS 1968).

3.3.2. Lektin histochemie

Für den Nachweis von Lektinbindungsstellen fanden Fluorescein-Isotiocyanat-markierte Lektine (FITC-Lektine) und mit Meerrettichperoxidase (englisch: horse-radish-peroxidase) konjugierte Lektine (HRP-Lektine) Verwendung (E.Y. Laboratories, San Mateo in Kalifornien).

Für die lichtmikroskopische Darstellung von Lektinbindungsstellen und für ihre semiquantitative Beurteilung wurden die in der Tabelle 1 angegebenen Lektine benutzt.

Nachweis von Lektinbindungsstellen mit FITC-Lektinen:

1. Entparaffinieren mit Xylol und Rehydratation der Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe bis Aqua dest.;
2. Einstellen in Phosphatpuffer für 20 Minuten bei Zimmertemperatur (PBS = phosphate buffered saline, pH 6,8 , Firma Serva Heidelberg , Zusammensetzung und Lösungsvorschrift nach DULBECCO u. VOGT 1954),
3. Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen fluoresceinmarkierter Lektine in einer abgedunkelten feuchten Kammer bei Zimmertemperatur für 30 Minuten (100 µg/ml ; 50 µg/ml ; 20 µg/ml) ;
4. Gründliches Abspülen ungebundener Lektine mit Phosphatpuffer,
5. Dehydrieren in aufsteigender Alkoholreihe bis Xylol;
6. Eindeckeln mit Fluorostab^R.

Die Schnitte wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop (Leitz Dialux 20) unter Auflichtfluoreszenz, bestehend aus einer Quecksilberhochdrucklampe und einem Filterblock zur Blauanregung für den Bereich von 450 bis 490 nm, beurteilt.

Nachweis von Lektinbindungsstellen mit HRP-Lektinen:

1. Entparaffinieren mit Xylol und absteigender Alkoholreihe bis 70%-igem Alkohol;
2. Inaktivierung der endogenen Peroxidase mit 10%-igem Methanol für 20 Minuten bei Zimmertemperatur;
3. Abspülen mit Aqua dest.;
4. Einstellen in Phosphatpuffer (pH 6,8) bei Zimmertemperatur für 10 Minuten;
5. Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen peroxidasemarkierter Lektine in einer feuchten Kammer bei Zimmertemperatur für 30 Minuten (100 µg/ml ; 50 µg/ml ; 20 µg/ml) ;
6. Gründliches Abwaschen der ungebundenen Lektine mit Phosphatpuffer;
7. Inkubation für 10 Minuten bei Zimmertemperatur mit einer Diaminobenzidinlösung (DAB; Firma Fluka, Schweiz), bestehend aus 0,5 mg DAB pro ml PBS, mit einem Zusatz von 10 µl einer 0,1%-igen Wasserstoffperoxidlösung;
8. Gründliches Abspülen mit Phosphatpuffer;
9. Vertiefung der Braunfärbung, also stärkere Kontrastierung, bei einigen Proben mit 0,1%-iger Osmiumsäure für 5 Minuten;
10. Gründliches Abspülen mit Phosphatpuffer;
11. Einstellen in eine aufsteigende Alkoholreihe bis Xylol;
12. Eindeckeln mit Eukitt (Firma Riedel-de Haen, Seelze).

Die Schnitte wurden mit einem Durchlichtmikroskop (Leitz Dialux 20), unter Verwendung eines Blaufilters, beurteilt.

Kontrollen für den histochemischen Nachweis der Lektinbindungsstellen:

1. Weglassen der Lektininkubation durch 30-minütiges Einstellen in Phosphatpuffer;
2. Kompetitive Hemmung der Lektinbindung durch Zusatz der entspre-

chenden Kohlenhydrate in einer Konzentration von 0,1 bis 0,4 Mol im Inkubationsmedium.

3.3.3. Immunhistochemie

Für die Darstellung von Zellen, die das Peptidhormon Calcitonin enthalten, wurde die Peroxidase-Antiperoxidase-Methode gewählt. Gewebeschnitte der Wachtelschilddrüse als Untersuchungsmaterial und Schnitte einer Rattenschilddrüse als Positivkontrolle wurden folgendermaßen behandelt:

1. Entparaffinieren mit Xylol und Rehydrierung bis 96%-igen Alkohol,
2. Inaktivierung der endogenen Peroxidase mit einer Lösung aus 0,3%-igem Wasserstoffperoxid und 75%-igem Methanol für 20 Minuten bei Zimmertemperatur in einer feuchten Kammer;
3. Einstellen in 70%-igem Alkohol für 5 Minuten;
4. Spülen mit Triton-TBS (Triton-tris-buffered-saline. Tris-Puffer-Lösung mit Kochsalz und 0,25% Triton X-100 , pH 7,6);
5. Inkubation mit Rinderserumalbumin für 20 Minuten bei Zimmertemperatur in einer feuchten Kammer zur Absättigung unspezifischer Eiweißbindungsstellen am Gewebe;
6. Spülen mit Triton-TBS;
7. Inkubation mit Calcitonin-Antikörpern (Primärantikörper) für 30 Minuten bei 4 °C in einer feuchten Kammer, die Primärantikörper stammen von Kaninchen, denen intrakutan synthetisches Human-Calcitonin appliziert worden ist (MILAB);
8. Spülen mit Triton-TBS;
9. Inkubation mit Anti-Kaninchen-Immunglobulin, das von der Ziege stammt, für 30 Minuten in der feuchten Kammer bei Zimmertemperatur; dabei entsteht der Antigen-Antikörper-Komplex;
10. Spülen mit Triton-TBS;

11. Inkubation mit dem Komplex aus Peroxidase und Kaninchen-Anti-Peroxidase (PAP), der mit dem Anti-Kaninchen-Immunglobulin reagiert, welches die Verbindung zwischen primärem Antikörper und PAP-Komplex herstellt; die Inkubation erfolgt über 30 Minuten in einer feuchten Kammer bei Zimmertemperatur;
12. Spülen mit Tris-Puffer;
13. Inkubation mit einer Lösung aus Tris-Puffer (0,05 molar; pH 7,6), 3,3-Diaminobenzidin und 3%-igem Wasserstoffperoxid für 40 Minuten in der feuchten Kammer bei Zimmertemperatur;
14. Spülen mit Aqua dest.;
15. Dehydrieren in aufsteigender Alkoholreihe bis Xylol und Eindeckeln mit Eukitt.

Die Durchführung des beschriebenen Verfahrens erfolgte mit Hilfe des MILAB ICC-Kit "Calcitonin", der von der Medac GmbH, Hamburg, bezogen wurde.

Die Beurteilung der Schnitte erfolgte mit einem Durchlichtmikroskop (Leitz Dialux 20), unter Verwendung eines Blaufilters.

3.4. Lichtmikroskopie an Semidünnschnitten

Von den in Araldit eingebetteten Schilddrüsenpartikeln wurden Semidünnschnitte mit einer Stärke von 1 μm mit Hilfe des Ultratom E der Firma Reichert-Jung angefertigt. Für die lichtmikroskopische Untersuchung dieser Schnitte kam die Anfärbung mit Methylenblau zur Anwendung.

3.5. Elektronenmikroskopie an Ultradünnschnitten

Für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden die in Araldit eingebetteten Gewebeteilchen mit dem Ultratom E ultradünn, ca. 50 nm,

geschnitten. Diese Schnitte wurden auf Kupfernetze aufgebracht und in einem LKB Ultrastainer 2168 mit Uranylacetat und Bleicitrat kontrastiert. Zur Auswertung diente das Elektronenmikroskop EM 902 der Firma Zeiss.

4. Ergebnisse

4.1. Makroskopische Befunde

Die Schilddrüsen der japanischen Wachtel sind dunkelrote, glänzende, ovoide Gebilde von 1,5 bis 3,5 mm Länge und 2 bis 3 mm Breite. Nach der Gefäßperfusion mit Glutaraldehyd nehmen sie einen blaßgrauen Farbton an, so daß sie vom peripheren Fettgewebe und den Thymuslappchen nur noch schwer zu unterscheiden sind. Bei zwei männlichen und drei weiblichen von je zehn Wachteln bleibt die linke Schilddrüse unauffindbar.

4.2. Befunde anhand der Standardfärbungen

4.2.1. Parenchym

Das Schilddrüsenparenchym besteht aus zahlreichen, unterschiedlich großen Follikeln. Die Ursache des stark variierenden Durchmessers liegt in der Schnittführung, die manche Follikel peripher und manche zentral trifft. Serienschnitte zeigen, daß es sich bei den Follikeln um gleich große Strukturen mit einem Durchmesser von 40 bis 50 µm handelt. (Abb. 1)

Das einschichtige Follikelepithel ist platt, manchmal isoprismatisch. Die Epithelzellen lassen sich gut gegeneinander abgrenzen. Innerhalb eines Follikels ist die Zellhöhe einheitlich. Bei den meisten Follikelzellen enthält das schwach azidophile Zytoplasma eine Vielzahl PAS-positiver feiner Granula, die in ihrer Größe kaum differieren und über den gesamten Zelleib gleichmäßig verteilt sind. Follikelepithelzellen, in denen keine oder nur wenige derartiger Granula sichtbar werden, enthalten ein helles, wabig-schaumiges Zytoplasma. Beide Zellbilder werden im Epithel ein und desselben Follikels gesehen (Abb.3). Mit Alzianblau färben sich die Granula nicht

an. Gelegentlich fallen auch Epithelzellen auf, die etwas kleiner als ihre Nachbarzellen sind und von Kolloid angefüllt erscheinen.

Der Zellkern ist, in Abhängigkeit von der Zellhöhe, kugelig bis queroval und liegt meist zentral, gelegentlich auch mehr basal, in den Zellen. Die meisten Kerne besitzen lockeres Chromatin, so daß mit Hämatoxylin nur eine sehr schwache basophile Anfärbung erzielt wird. Jeder Zellkern enthält ein bis drei Kernkörperchen; die Nukleoli erscheinen als kleine, runde, stark basophile Gebilde. (Abb.2)

Im Follikellumen imponiert das Schilddrüsenkolloid als homogene Substanz ohne erkennbare Strukturmerkmale. Bei den Paraffinschnitten zeigt sich, daß zwischen Kolloid und lumenseitigem Epithelrand ein unregelmäßig breiter, freier Raum besteht. Darüber hinaus finden sich am Kolloidrand immer wieder Vakuolen. Manche Follikel enthalten überhaupt kein Kolloid. Schilddrüsenkolloid färbt sich deutlich eosinophil. Es erweist sich weiter als stark PAS-positiv und Alzianblau-negativ. Trichromfärbungen, wie etwa die Azanfärbung nach Heidenhain, liefern selbst innerhalb desselben Follikels eine nahezu gleichmäßige rote Anfärbung.

Sogenannte "parafollikuläre" Zellen, wie sie in der Schilddrüse von Säugern vorkommen (BLÄHSER 1978), konnte ich in der Thyroidea der japanischen Wachtel nicht finden.

4.2.2. Stroma

Eine dünne Bindegewebskapsel umschließt das Follikelkollektiv. An ihr kann man eine periphere Zone, die kompakt und zellreich ist, und eine innere Zone, die aufgelockert und kernarm ist, unterscheiden. Ferner lassen sich vorwiegend an der Kapselinnenseite zahlreiche kleine Venen, Arteriolen und gelegentlich umschriebene Ansammlungen von Lymphozyten erkennen. (Abb.2)

Zarte, leicht gewellte Kollagenfibrillen ziehen von der Bindegewebskapsel ins Organinnere. Die interfollikulären Faserbündel sind im Gegensatz zur Säugerschilddrüse von derart feiner Beschaffenheit, daß sich eine Zusammenfassung der Follikel zu Schilddrüsenläppchen nicht erkennen läßt.

"Freie" Zellen oder "Wanderzellen", wie Mastzellen und Leukozyten, können sporadisch festgestellt werden.

Arteriolen treten in erster Linie an der Schilddrüsenperipherie auf. In den schmalen interfollikulären Räumen finden sich reichlich Venolen, Kapillaren und Sinusoide, so daß eine sehr enge Nachbarschaft zwischen Blutgefäßen und Follikel epithel gegeben ist. Der Grad der Sichtbarkeit des engmaschigen Blutkapillarnetzes hängt nicht zuletzt vom Füllungszustand ab; besonders fallen dabei die spindelförmigen, kernhaltigen Vogelerythrozyten auf. Intrathyreoidale Lymphbahnen sind nicht zu sehen; man muß davon ausgehen, daß sie kollabiert sind.

Durch Silberimprägnation werden sowohl in der Bindegewebskapsel als auch im interfollikulären Bereich zahlreiche feine Nervenfasern sichtbar; als zartes Netz umspinnen sie die Schilddrüsenbläschen und die Blutgefäße.

4.3. Semidünnschnitte

Die mit Methylenblau gefärbten Semidünnschnitte zeigen Follikel, deren Konturen strenger oval bis polyedrisch gezeichnet sind als bei den Paraffinschnitten. Im Querschnitt getroffene Epithelzellen weisen im apikalen Zellbereich dunkelblaue Kolloidtröpfchen auf; bis zu acht annähernd gleich große Vesikel lassen sich hier gut voneinander unterscheiden. Auch die Kernmembran und die Kernkörperchen kommen aufgrund ihrer tiefblauen Farbe deutlich zur Darstellung. Den Kern umschließt allseitig das blaß-blaugraue Zytoplasma.

Im Gegensatz zu den Paraffinschnitten ist bei den Semidünnschnitten der Übergang von den homogenen, gleichmäßig dunkelblauen Kolloidmassen zum lumenwärtigen Epithelrand nahtlos.

Das Stroma erfährt nur eine blaßblaue Tönung; die Blutgefäße, insbesondere die Venen, Venolen, Kapillaren und Sinusoide, erweisen sich infolge der Perfusionsfixierung als weitlumig und arm an Erythrozyten. (Abb.4)

4.4. Befunde der lektinhistochemischen Untersuchungen

Von den 13 angewandten Lektinen können mittels Fluorescein-Isothiocyanat-Markierung Bindungsstellen für sechs Lektine nachgewiesen werden, und von den neun Lektinen mit Meerrettichperoxidase markierung ergeben sich Bindungsstellen für fünf Lektine.

Bei Inkubation mit *Griffonia simplicifolia* I und II (GS-I und GS-II), *Helix pomatia* (HPA), *Glycine max* (SBA) und *Ulex europaeus* II (UEA-II) Lektin kommt es, unabhängig von der Markierungsart, zu keiner Reaktion. Darüber hinaus sind mit FITC-markiertem *Dolichos biflorus* (DBA) und *Ulex europaeus* I (UEA-I) Lektin sowie mit HRP-markiertem *Maclura pomifera* (MPA), *Arachis hypogaea* (PNA) und *Ricinus communis* II (RCA-II) Lektin keine Bindungsstellen nachweisbar.

Die Schnitte mit einer positiven Reaktion für Lektinbindungsstellen werden nach folgendem Schema semiquantitativ bewertet:

- negativ
- + schwach positiv
- ++ mittelstark positiv
- +++ stark positiv

4.4.1. FITC-Lektine

In allen drei Verdünnungsstufen kommt es in abnehmender Reihenfolge der Konzentrationen bei der Anwendung von *Canavalia ensiformis* (CON A) auch zu einer abnehmenden Fluoreszenz der Follikelepithelzellen. Im gesamten Bereich des Zellkörpers imponiert das stark grünlich fluoreszierende Zytoplasma, wobei eine negative, diffus verteilte Granulierung auffällt; die Kerne werden aus der Fluoreszenz deutlich ausgespart. Die unscharfe Abgrenzung benachbarter Epithelzellen und der nur noch schwach wahrnehmbare basale und apikale Zellwandbereich weisen darauf hin, daß die Zytoplasmamembran keine Bindungsstellen für CON A besitzt. Kolloid und interfollikuläres Stroma fluoreszieren nicht. Erythrozyten erweisen sich als stark positiv, was aber wegen des gelblich-braunen Farbtönen als unspezifisch gewertet werden muß. In der Bindegewebskapsel können lediglich im peripheren Fibrozytensaum vereinzelt unspezifisch fluoreszierende Kollagenfasern entdeckt werden. Elastische Elemente der Arterien und Arteriolen sowie das Gefäßendothel zeigen nur Autofluoreszenz. (Abb.5)

An Kontrollpräparaten, bei denen zum CON A-Lektininkubationsmedium der niedrigsten Konzentrationsstufe 0,4-molares Methyl-A-Mannopyranosid zugesetzt worden ist, führt dies zu einer völligen Hemmung der spezifischen Reaktion.

Die Reaktion mit der ersten und zweiten Verdünnungsstufe des Lektins von *Maclura pomifera* (MPA) liefert im supranukleären Bereich lediglich eine mäßige Fluoreszenz; dabei erscheint das apikale Zytoplasma als negativ granuliert, und die lumennahe Plasmamembran reagiert stellenweise, und nur an einigen Follikeln, positiv. Das Kolloid und das gesamte Stroma erweist sich als negativ. (ohne Abb.)

Ähnliche Resultate, allerdings mit nur kaum wahrnehmbarer Fluoreszenz selbst bei hoher Lektinkonzentration, sind bei den Lektinen von *Arachis*

hypogaea (PNA) und *Ricinus communis* I (RCA-I) zu verzeichnen. Letzteres offenbart überdies in den ersten beiden Verdünnungsstufen eine deutliche Affinität zum Bindegewebe der Schilddrüsenkapsel; die kollagenen Fasern im interfollikulären Stroma fluoreszieren jedoch nicht. (ohne Abb.)

In der Reihenfolge sinkender Konzentrationen reagiert *Ricinus communis* II (RCA-II) Lektin in allen drei Verdünnungsstufen mit abnehmender Intensität mit den Follikelepithelzellen und der Bindegewebskapsel. Das Zytoplasma der Parenchymzellen zeigt in der apikalen Region eine deutliche Fluoreszenz. Weiter reagieren die apikalen Zellmembranen deutlich positiv. RCA-II-affines Bindegewebe beschränkt sich wiederum nur auf die Kapsel. Im interfollikulären Bereich können keine Bindungsstellen für RCA-II beobachtet werden. (ohne Abb.)

Eine vollständige kompetitive Hemmung der Lektinbindung an Kontrollpräparaten erfolgt für MPA, PNA, RCA-I und RCA-II mit 0,2-molarer D-Galaktose-Lösung.

Die Untersuchungen mit *Triticum vulgare* (WGA) ergeben in allen drei Konzentrationsstufen eine gleichermaßen stark positive Reaktion mit den Follikelepithelzellen und der Bindegewebskapsel. Weitere Verdünnungsansätze zeigen, daß erst bei einer Konzentration von 5 µg/ml die Fluoreszenz des beschichteten Schilddrüsengewebes ausbleibt. Die im apikalen Zellbereich kräftige Fluoreszenz nimmt zum basalen Teil der Zelle hin deutlich ab. Bei flachem Epithel weist der positive supranukleäre Zellabschnitt eine keulenartige Gestalt auf, da sich der negative Kern bis an die positive apikale Zellmembran drängt. Im fluoreszierenden Bereich bleiben runde Bezirke ausgespart. Das Kapselbindegewebe weist stark fluoreszierende Faserzüge auf, die vor allem in der Kapselperipherie reichlich vertreten sind. Im übrigen Stroma ist nur eine mäßige Autofluoreszenz der Gefäßendothelien und der Erythrozytenkerne nachweisbar. (Abb.6)

Bei der Kontrolle wird die spezifische Bindung von WGA an die reaktiven Gruppen im Gewebe durch Zusatz einer 0,1-molaren Neuraminsäurelösung zum Inkubationsgemisch, das 10 µg Lektin pro ml enthält, verhindert.

4.4.2. HRP-Lektine

Das Zytoplasma der Follikel epithelzellen weist eine mittelgradige Affinität zum HRP-konjugierten CON A auf, die mit abnehmender Lektinkonzentration nachläßt. Die ungefärbten Kerne werden von unterschiedlich großen, nahezu gleich stark positiven granulaartigen Gebilden umgeben. Benachbarte Zellen lassen sich nicht klar voneinander abgrenzen. Kolloid und Stroma reagieren nur ganz schwach positiv. (Abb.7)

Lediglich der periphere Fibrozytensaum der Bindegewebskapsel und gelegentlich Bindegewebszüge im interfollikulären Stroma erweisen sich mit DBA mäßig positiv; die Kerne der Bindegewebszellen zeigen keine Reaktion. (ohne Abb.)

Zu einem vergleichbar ähnlichem Ergebnis führt die Anwendung von UEA-I. Hier läßt sich allerdings eine etwas kräftigere Färbung feststellen. Diese schwächt sich von einem stark positiven peripheren Saum der Bindegewebskapsel zu den parenchymnahen Fasern hin ab. (ohne Abb.)

Bei beiden Lektinen reicht die Konzentration von 20 µg/ml für eine Darstellung ihrer Bindungsstellen nicht mehr aus.

RCA-I erzielt aufgrund seiner Affinität zum Follikelzellplasma in allen drei Verdünnungsstufen eine konzentrationsabhängige Färbungsintensität. Im Bereich des Golgi-Apparates fällt eine stark positive Granulierung auf. Der basale Zellabschnitt, in dem hauptsächlich endoplasmatisches Retikulum und Mitochondrien vorkommen, zeigt lediglich eine schwach positive Reaktion. In einigen Abschnitten lassen sich an der lumenseitigen Zellmembran Bindungsstellen für RCA-I nachweisen. Eine stark positive

Reaktion ist im gesamten Bindegewebe der Kapsel erkennbar; Gewebselemente im interfollikulären Stroma reagieren dagegen nur schwach. (ohne Abb.)

Im Follikelepithel finden sich vorwiegend paranukleär und supranukleär stark WGA-positive Granula. Sie reichen nur bei einem Teil der Zellen bis an die apikale Membran. Kolloid und interfollikuläres Stroma zeigen eine blasse unspezifische Brauntönung. Das Bindegewebe der Schilddrüsenkapsel verfügt über einen sehr schmalen, unregelmäßig stark positiven Saum an der Peripherie. Im übrigen Kapselgewebe finden sich vereinzelt WGA-positive Fibrozyten. (Abb.8)

Schnitte, die mit Osmiumsäure zusätzlich kontrastiert worden sind, ergeben zwar einen stärkeren Färbungsgrad, jedoch bleibt der gewünschte Kontrast aus, weil auch an sich negativ reagierende Strukturen eine stärkere Bräunung erfahren.

Kontrollpräparate, bei denen die Lektine weggelassen werden, reagieren farblos. Eine weitere Kontrollreihe, bei der Methanol und Lektin weggelassen, liefert Präparate, die mit bräunlichen Granula übersät sind. Mit diesem Nachweis der endogenen Peroxidase ist die Erfordernis der Hemmung endogener Peroxidase für die Sichtbarmachung der Lektinbindungsstellen verdeutlicht.

4.4.3. Vergleich zwischen FITC- und HRP-Lektinaffinität

Von neun Lektinen, die zum einen mit FITC, zum anderen mit HRP markiert sind, reagieren DBA, PNA und RCA-II nur mit Fluorescein-Markierung positiv, UEA-I zeigt dagegen nur dann eine positive Reaktion, wenn es mit Meerrettichperoxidase konjugiert ist. Unabhängig von der Markierungsart liefern lediglich CON A, RCA-I und WGA eine nahezu gleichförmige Affinität zu bestimmten Strukturen. (Tabelle 2 und 3)

4.5. Befunde der immunhistochemischen Untersuchung

Der immunhistochemische Nachweis calcitoninhaltiger Zellen in der Schilddrüse der japanischen Wachtel führt zu keinen positiven Ergebnissen. Sporadisch zeigen vereinzelte Follikelepithelzellen eine schwache Brauntönung, die jedoch als unspezifisch gewertet werden muß (Abb.9).

Im Gegensatz zur Wachtelthyroidea liefert die Rattenschilddrüse, die als Positivkontrolle mitgeführt wurde, eindeutig positiv reagierende Zellen im parafollikulären Bereich (Abb.10).

4.6. Elektronenmikroskopische Befunde

4.6.1. Follikelepithelzellen

Das einschichtige Follikelepithel wird aus einer Aneinanderreihung flacher bis isoprismatischer Zellen gebildet. An der apikalen Membran sitzen vereinzelt stummelförmige Mikrovilli (Abb.12).

Der Interzellularspalt zwischen den lateralen Plasmamembranen benachbarter Follikelzellen weist annähernd konstante Breite und teils geradlinigen, teils unregelmäßig geschwungenen Verlauf auf. Kontaktstellen zweier aneinandergrenzender Epithelzellen können nur apikal am Anteil der seitlichen Zellmembranen festgestellt werden. Sie bestehen aus einer Zonula occludens und einer sich daran anschließenden Zonula adhaerens. (Abb.11)

Eine Basalmembran umscheidet ohne Unterbrechung das gesamte Follikelepithel. Wegen ihrer mäßigen Dichte erscheint sie meist nur als undeutliche Linie. (Abb.12)

Der große rundliche Kern liegt zentral in der Zelle. Er enthält zwei bis drei Nukleoli. Sein Heterochromatin sammelt sich ungleichmäßig an der

Innenseite der Kernhülle an. Die paranukleären Zisternen stehen an einigen Stellen mit dem granulären endoplasmatischen Retikulum in Verbindung. (Abb.13)

Mit Ribosomen besetztes endoplasmatisches Retikulum tritt vorwiegend im mittleren und basalen Zellbereich auf. Seine unregelmäßig weiten Zisternen sind teils parallel gestapelt, teils ungleichmäßig angeordnet. (Abb.14)

Freie Ribosomen bzw. Polyribosomen kommen kaum vor.

Der Golgi-Apparat liegt im apikalen, zum Teil auch im mittleren Zellabschnitt. Er besteht aus Stapeln parallel angeordneter Zisternen, an deren Schmalseite sich helle Bläschen abschnüren. (Abb.13)

Sekretgranula von unterschiedlicher Größe und einem Inhalt, der elektrodichter als das Kolloid ist, erscheinen bevorzugt im para- und paranukleären Bereich. Darüber hinaus gibt es in diesen Zellabschnitten verschieden große Vesikel mittlerer und geringer Dichte. (Abb.13 und 14)

Die zahlreichen Mitochondrien vom Crista-Typ liegen im Zytoplasma mehr oder weniger gleichmäßig verteilt. Die Matrix der Mitochondrien ist von mäßiger Dichte. (Abb.14)

4.6.2. Interfollikulärer Raum

Der Raum zwischen den Basalmembranen benachbarter Follikel ist entweder sehr schmal, unstrukturiert und von geringer Dichte oder von den darin enthaltenen Blutkapillaren ausgefüllt. Zwischen Kapillaren und Follikelzellen besteht eine sehr enge Nachbarschaft, da sie nur von ihren Basalmembranen und einer schmalen, strukturlosen Schicht, in der gelegentlich Perizyten liegen, getrennt werden. (Abb.11)

Die Basalmembran, die eine Kapillare umhüllt, hat die gleiche Dicke und das gleiche Erscheinungsbild wie die der Follikel.

Endothelzellen, die an der Formierung einer Kapillare beteiligt sind, werden von "tight junctions" verbunden. Die Endothelzellen selbst sind sehr dünn. Lediglich im Bereich des Zellkerns ist der Zelleib verbreitert. Dünne Zytoplasmafortsätze unterschiedlicher Größe ragen in das Gefäßlumen. Fenestrierungen der Endothelzellmembranen lassen sich nicht feststellen. Calcitonin-Zellen sind weder parafollikulär noch intrafollikulär auffindbar.

5. Diskussion

Die bei der japanischen Wachtel (*Coturnix coturnix japonica*) gelegentlich auftretende Hemiagenesis der Schilddrüse (WIGHT 1986) läßt sich anhand der eigenen Untersuchungen bestätigen. So blieb bei der Probenentnahme jeweils die linke Thyroidea bei 2 männlichen und 3 weiblichen Wachteln unauffindbar.

Die Abmessungen der Wachtelschilddrüse, wie sie von FITZGERALD (1969) angegeben werden, treffen nur bedingt zu. Nach meinen Untersuchungen sind sie vor allem in der Breite, nämlich bis zu 2 mm, manchmal auch in der Länge bis zu 3 mm groß. Damit hat die Thyroidea ovoide Gestalt. Die Maße, die von FITZGERALD (1969) ermittelt worden sind, würden dem Organ eher eine spindelförmige Kontur zuschreiben.

Die starke Vaskularisation der Drüse ist bereits makroskopisch erkennbar. Die infolge der Blutfülle dunkelroten Schilddrüsen können nach der Durchspülung des Gefäßsystems kaum noch von ihrer speckig-grau glänzenden Umgebung differenziert werden.

Die lichtmikroskopischen Untersuchungen zeigen bereits in der Übersichtsvergrößerung, daß die Wachtelthyroidea in ihrem Aufbau mit den Beschreibungen von Schilddrüsen anderer Vogelarten weitgehend übereinstimmt. Eine zarte Bindegewebskapsel umschließt das Parenchym. Dieses besteht aus rundlichen Follikeln, deren einschichtiges Epithel kolloidhaltige Hohlräume begrenzt. Zwischen den Drüsenbläschen finden sich nur spärlich Bindegewebszüge, in denen Nerven und Blutgefäße liegen und netzartig die Follikel umspinnen.

Weder die Heterogenität im Aufbau der Schilddrüse, die aus Randfollikeln und großen zentral gelegenen Follikeln besteht (ASTIER 1980), noch die bei Hühnern beschriebenen Riesenfollikel (TSUTSUI 1958) können an den

Gewebeschnitten der Wachtelthyroidea beobachtet werden. Allerdings stammt das eigene Untersuchungsmaterial von Tieren, die ständig Licht und Wärme ausgesetzt waren, was Einfluß auf die Höhe des Schilddrüsen-follikel-epithels nimmt. Aus den Untersuchungen ist bekannt, daß es nur plattes, gelegentlich auch isoprismatisches Epithel und weitlumige Drüsenbläschen vorweisen kann. Es bleiben englumige Follikel, in Verbindung mit hochprismatischem Epithel, aus. Selbstverständlich zeigen einzelne Gewebeschnitte Schilddrüsenbläschen mit scheinbar kleinem Lumen, jedoch beweist die Schnittserie, daß sie von der Schnittebene her nicht zentral, sondern tangential getroffen sind. Das Schilddrüsenparenchym liefert insgesamt das Bild einer inaktiven oder nur geringfügig aktiven Glandula thyroidea.

Die PAS-Reaktion erfaßt allgemein Polysaccharide, neutrale Mukopolysaccharide, Muko- und Glykoproteine sowie Lipide (ROMEIS 1968). Dabei werden 1,2-Glykol- und α -Amino-Alkoholgruppen durch Perjodsäure zu Aldehydgruppen oxidiert, die sich mit Schiff'schem Reagenz nachweisen lassen (VAN HEYNINGEN 1965). Angesichts der Follikel-epithelzellen, die reichlich PAS-positive Granula enthalten, und auch des PAS-positiven Kolloids erhebt sich die Frage nach der Substanzgruppe, die hier färbetechnisch dargestellt wird. Orientiert man sich an den physiologischen Grundlagen, so handelt es sich, zumindest beim Kolloid, ausschließlich um Glykoproteine. Lipide werden bereits während der Einbettung in Paraffin und bei der Bearbeitung mit Xylol aus dem Gewebe extrahiert. Alzianblau färbt zwar Mukopolysaccharide selektiv, jedoch sind Mukosubstanzen bisher nur bei wenigen Spezies, so in der menschlichen Schilddrüse (HARACH 1985) und in der Thyroidea der Fledermaus (VARUTE u. NALAWADE 1972), gefunden worden. Folglich kann es sich bei den Granula in den Epithelzellen der Wachtelschilddrüse nur um glykoprotein- oder polysaccharidhaltige Partikel handeln. VELICKY et al. (1977), der beim Fasan zwar auch PAS-

positives Kolloid und sehr kleine, rundliche Vakuolen mit PAS-positivem Inhalt beschreibt, interpretiert seinen Befund nicht.

Die sporadisch auftretenden Zellen im Epithel, die mit Kolloid gefüllt sind, gelten als degenerierende Formen. Sie werden auch Kolloidzellen genannt (BARGMANN 1977).

Der bei den Paraffinschnitten auftretende Spalt zwischen Kolloid und Follikelepithel ist wahrscheinlich auf die Kolloidschrumpfung zurückzuführen, die bei der Entwässerung des Materials entsteht (HAMMERSEN 1985). Die Vakuolen am Kolloidrand können sowohl als Sekretions- als auch als Resorptionsvakuolen interpretiert werden. Ihr Vorkommen deutet auf ein aktives Drüsenepithel hin. Möglicherweise handelt es sich aber auch hierbei um Fixierungs- bzw. Schrumpfungsvakuolen, also um Artefakte (VON MAYERSBACH 1976).

Die Bindegewebskapsel der Vogelschilddrüse wird als dünne Kollagenkapsel beschrieben (SCHESCHIN 1925, FRITSCHI 1926, FEDER 1971, ASTIER 1980; HODGES 1981). Ein zweischichtiger Aufbau der Organkapsel der Thyroidea bei der japanischen Wachtel ist bisher noch nicht erwähnt worden, wohl aber liegen entsprechende Beschreibungen für die menschliche Schilddrüse vor (JUNQUEIRA 1986).

Eine Aufteilung des Parenchyms in Läppchen durch Bindegewebszüge, wie es bei den Säugern üblich ist, wird zwar von FORSYTH (1908) für die Schilddrüse verschiedener Vogelarten und von FITZGERALD (1969) für die Thyroidea der japanischen Wachtel angeführt, konnte aber in meinem Untersuchungsmaterial nicht beobachtet werden. Auch die übrigen Autoren, die sich mit Vogelschilddrüsen befaßt haben, erwähnen keine Lobulierung.

Die lichtmikroskopische Darstellung der intrathyroidalen Lymphbahnen war in meinem Material nicht möglich. Sie sind vermutlich kollabiert und könnten erst nach einer Abklemmung der großen zervikalen Lymphgefäße in vivo, also durch Rückstauung, erkannt werden (EICKHOFF 1965).

Aus früheren biochemischen und cytochemischen Untersuchungen geht hervor, daß das Glykoprotein Thyroglobulin - je nach Tierspezies - acht bis zehn Prozent Kohlenhydrate enthält (SPIRO u. SPIRO 1965). Dabei werden zwei Kohlenhydrateinheiten differenziert, von denen jede über Asparagin mit der Peptidkette des Thyroglobulin verbunden ist. Die erste Einheit besteht aus fünf bis zehn Mannosemolekülen und zwei N-Azetylglukosaminmolekülen (ARIMA u. SPIRO 1972), die andere Einheit verfügt über Neuraminsäure, Fukose, Galaktose, Mannose und N-Azetylglukosamin. Neuraminsäure nimmt dabei eine terminale Position ein (SPIRO u. SPIRO 1965). Jedes Thyroglobulinmolekül enthält schätzungsweise 23 solcher Kohlenhydrateinheiten und damit bis zu 300 Monosaccharide (SPIRO 1965).

Die thyroidalen Follikel epithelzellen besitzen Thyroglobulin und geben es in das Follikellumen ab, von wo es bei Bedarf reabsorbiert wird. Die Biosynthese des Thyroglobulin erfolgt in drei Stufen: Nach der Synthese des Proteinanteils, die im endoplasmatischen Retikulum erfolgt, wird schon dort Mannose an den Eiweißkörper gebunden (WHUR et al. 1969). Daraufhin kommt es mittels zuckerübertragender Enzyme zur schrittweisen Anlagerung von Monosaccharidresten an die Polypeptidkette (SPIRO u. SPIRO 1966). Im Golgi-Apparat wird der Kohlenhydratanteil modifiziert, wobei Galaktose eingebaut wird (WHUR et al. 1969). Schließlich findet noch die Jodierung statt, wobei das Thyroglobulin der Vögel 1,5 Gewichtsprozent Jod, das der Säuger lediglich 0,5 Gewichtsprozent Jod enthält (HOSHINO u. UI 1970; SORIMACHI u. UI 1974).

Kohlenhydrate, die mit Lektinen nachgewiesen werden können, kommen sowohl in den Zellmembranen als auch im Kolloid und in der strukturierten Grundsubstanz vor (Bargmann 1977; HARPER 1986).

Unabhängig von der Art der Markierung zeigt Concanavalin A, das sich spezifisch an Oligosaccharide mit endständigem α -Mannose-Rest oder

α -Glukose-Rest bindet, eine deutliche Anfärbung des gesamten Follikel-epithels, von dem aber der Kern ausgespart bleibt. Auffallend ist, daß mit CON A keine Bindungsstellen im Interstitium nachgewiesen werden konnten. An Gefrierschnitten bzw. an trypsinbehandelten Paraffinschnitten menschlicher Schilddrüsen erhält man mit FITC-markiertem CON A ein ganz anderes Verteilungsmuster der CON A-Bindungsstellen als bei der Wachtelthyroidea; abgesehen von den stark positiven Follikel-epithelzellen wird auch am Kolloid und am Stroma intensive Fluoreszenz beobachtet (SOBRINHO-SIMÕES u. DAMJANOV 1986). In der Wachtelschilddrüse lassen sich, im Gegensatz zu anderen Organen und anderen Tierarten, weder Bindegewebsstrukturen, noch das Endo- oder Perineurium der Nerven (THOSS u. ROTH 1975), noch die Basalmembran der Gefäßendothelien (BRETTON u. BARIETY 1976) mit CON A anfärben.

Von den drei Lektinen der N-Azetylglukosamingruppe, nämlich WGA, UEA-II und GS-II, können nur für WGA Bindungsstellen an der Wachtelthyroidea nachgewiesen werden, unabhängig davon, mit welchem Marker das jeweilige Lektin konjugiert ist. Der Grund für diese unterschiedliche Reaktivität kann vielleicht auf ihre Zugehörigkeit zu verschiedenen Lektinklassen zurückgeführt werden (GALLAGHER 1984). So bindet GS-II N-Azetylglukosamin, das am nicht-reduzierendem Ende einer Kohlenhydratkette sitzt, während für die Bindung mit WGA und UEA-II die Anwesenheit des komplementären Monosaccharids allein nicht genügt, sondern eine spezifische Zuckersequenz gefordert wird. Für WGA muß eine heterotypische Sequenz aus zwei oder mehreren verschiedenen Monosacchariden gegeben sein, für UEA-II eine homotypische Sequenz, die aus identischen Zuckereinheiten besteht (GALLAGHER 1974). Die Inkubation von Schnitten der menschlichen Thyroidea mit diesen drei Lektinen führt zu Ergebnissen, die mit denen von den Untersuchungen an der Wachtelschilddrüse vergleichbar sind (SOBRINHO-SIMÕES u. DAMJANOV 1986). WGA-Bindungsstellen finden

sich im para- und supranukleären Bereich der Follikelzellen, an der apikalen Zellmembran und im Bindegewebe. Sie weisen auf Oligosaccharide mit terminalem N-Azetylglukosamin hin. Untersuchungen an Zellfraktionen von Rattenorganen zeigen, daß nicht nur Golgi-Membranen, sondern auch Bestandteile des endoplasmatischen Retikulums WGA binden können (WINQUIVIST et al. 1976).

Für die Lektine von *Ricinus communis*, RCA-I und RCA-II, die sich beide an Galaktose und N-Azetylgalaktosamin binden (LIENER et al. 1986), besteht an der Wachtelschilddrüse ein mit WGA vergleichbares Affinitätsmuster. Unterschiede werden allerdings durch die Art der Markierung bedingt. So ist mit RCA-I-HRP eine deutlich positive Reaktion zu sehen, während das gleiche Lektin bei Konjugation mit FITC nur schwach reagiert. Umgekehrt erhält man mit RCA-II-FITC eine intensive Fluoreszenz, mit Meerrettich-Peroxidase verknüpftem RCA-II sind dagegen keine Bindungsstellen nachweisbar.

Das Vorkommen von Galaktoseresten, die im Golgi-Apparat der Follikel-epithelzellen in das Thyroglobulin eingebaut werden, wird, außer mit den Lektinen von *Ricinus communis*, auch noch von der MPA- und PNA-Affinität des supranukleären Zytoplasmabereiches, der dem Golgi-Apparat entspricht, bestätigt.

Die Darstellung von DBA-Rezeptoren, die terminales, nicht-reduzierendes, α -gebundenes N-Azetyl-D-Galaktosamin enthalten (LIENER et al. 1986), beschränkt sich, wie die von UEA-I-Bindungsstellen, die α -L-Glukose besitzen (LIENER et al. 1986), auf das Bindegewebe der Wachtelschilddrüse; beide Lektine zeigen nur mit dem HRP-Marker Reaktivität. Es kommt allerdings zu keiner Anfärbung des Endothels. Bei anderen Spezies finden DBA und UEA-I zur Markierung von Gefäßendothel verbreitete Anwendung. So können Blutgefäße adulter Mäuse mit DBA-FITC (WATANABE et al. 1981) und Blutgefäßendothelien von Mäuseembryonen des NMRI-Stammes mit

DBA-HRP (PLENDL u. SCHMAHL 1986) selektiv angefärbt werden. HOLTHÖFER et al. (1982) verwendet das FITC-markierte UEA-I für den Nachweis von Gefäßendothel in Gefrierschnitten unterschiedlicher menschlicher Organe. Darüber hinaus hat sich Peroxidase-konjugiertes UEA-I als Endothelmarker bei normalen und tumorös entarteten menschlichen Schilddrüsen bewährt (GONZALEZ-CAMPORA et al. 1986, STEPHENSEN et al. 1986). Trotz der Spezifität des UEA-I für thyroideale Endothelzellen humaner Schilddrüsen scheint es, bei der Ratte keine UEA-I-Rezeptoren an Endothelzellen zu geben (GONZALEZ-CAMPORA et al. 1986).

Obwohl HPA, SBA und GS-I genauso wie DBA, MPA, PNA, RCA-I und RCA-II der N-Azetylgalaktosamin- bzw. Galaktose-Gruppe angehören, zeigen sie an der Wachtelthyroidea keine Reaktion. Dies deckt sich jedoch mit den Beobachtungen an der menschlichen Schilddrüse (SOBRINHO-SIMÕES u. DAMJANOV 1986).

Diese Unterschiede zwischen eigenen Ergebnissen und den Resultaten über Lektinbindungsstellen in verschiedenen anderen Organen und Spezies beruhen auf einer Reihe von Faktoren, zu denen die Art der Gewebepreparation, -behandlung und -einbettung gehören.

So soll durch die Aldehydfixation die Lektinbindung am Gewebe beeinträchtigt werden (SCHWECHHEIMER et al. 1984). Bei der Fixierung sollen Kohlenhydratreste von Glykoproteinen durch die Proteindenaturierung, also durch die Änderung der räumlichen Molekülstrukturen, abgespalten werden, außerdem löst der Prozeß der Paraffineinbettung Glykolipide heraus (LEATHAM u. ATKINS 1983). Proteolytische Enzyme, wie Trypsin, können die Affinitätseinbuße durch Fixierung weitgehend rückgängig machen, wobei wahrscheinlich die maskierten Kohlenhydratreste freigelegt werden (WEST et al. 1982).

Für viele Lektine ist die Anwesenheit von Metallionen erforderlich, damit die Bindungsstellen reagieren; Puffersalze, wie Phosphat, präzipitieren

diese Ionen und vermindern damit die Lektinbindung (LEATHEM u. ATKINS 1983).

Weiter kann es trotz vorschriftsmäßiger Verwendung vorkommen, daß eine bestimmte Lektincharge kein positives Ergebnis erzielt, das dann fälschlicherweise als negativ gewertet wird (PLENDL u. SCHMAHL 1986).

Warum verschiedene Lektinkonjugate, wie HRP im Vergleich zu FITC, teilweise unterschiedliche Resultate bedingen, ist unklar. Möglicherweise kommt es bei bestimmten Markierungsarten zur Blockierung von Bindungsstellen (LEATHEM u. ATKINS 1983).

Letztendlich sind speziesspezifische Unterschiede, aber auch die physiologische oder pathologische Situation des untersuchten Gewebematerials für den Lektinbindungsstellennachweis wichtig (PLENDL u. SCHMAHL 1986).

Da die Kontrollversuche der eigenen Untersuchungen mit der kompetitiven Hemmung zu einem negativen Ausfall der histologischen Resultate führten, können die positiven Ergebnisse, trotz Bouin-Fixierung und Paraffineinbettung der Organe, als spezifisch gewertet werden.

Für den spezifischen Nachweis von Calcitonin-Zellen in der Schilddrüse werden verschiedene Methoden vorgeschlagen, die aber nicht immer zu einer eindeutigen Identifizierung führen. Die Färbung mit Hämatoxylin und Eosin zeigt nur die relativ großen Zellkerne und eine schwache Anfärbbarkeit des Zytoplasmas (KAMEDA 1968). Eine Unterscheidung zwischen Follikelzellen und parafollikulären Zellen anhand des Vorkommens von intrazellulären PAS-positiven Kolloidtröpfchen erweist sich als unzuverlässig (STUX et al. 1961, ITO et al. 1964). Die selektive Färbung endokriner Zellen mit basischen Farbstoffen nach saurer Hydrolyse (SOLCIA et al. 1968), die Verwendung von 1.9-Dimethyl-Methylenblau (PETKO 1974) oder von Blei-Hämatoxylin (SOLCIA et al. 1969) wurden be-

schrieben. Versilberungsmethoden, bei denen sich die kleinen Granula der Calcitonin-Zellen bräunen oder schwärzen (BARGMANN 1977), erlauben gleichfalls nicht immer die zweifelsfreie Unterscheidung zwischen Follikelzellen und C-Zellen (BLÄHSER u. KRAUS 1972; SAWICKI u. BAJKO 1974). Eine klare Differenzierung liefern dagegen immunhistochemische Methoden, mit denen der direkte Nachweis endokriner Zellen nicht nur bei diversen Säugetieren (BLÄHSER 1978; TSUCHIYA et al 1984, SANDUSKY u. WIGHTMAN 1985), sondern auch schon bei Vögeln (KAMEDA 1984) geführt wurde.

Da sich bei den eigenen immunocytochemischen Untersuchungen am Schilddrüsen Gewebe der japanischen Wachtel keine positiven Ergebnisse zeigten, Kontrollschnitte von der Rattenthyroidea hingegen eindeutig positive Befunde ergaben, müssen verschiedene Möglichkeiten für den unterschiedlichen Reaktionsausfall in Betracht gezogen werden. In der Wachtelschilddrüse sind keine Calcitoninzellen vorhanden, oder das verwendete Antiserum zeigt keine Kreuzreaktion mit dem Wachtelcalcitonin.

Für die erste Hypothese spricht, daß auch bei der Hämatoxylin-Eosin- bzw. PAS-Färbung sowie an den Semidünn- und Ultradünnschnitten keine C-Zellen zu sehen waren. Ebenso lassen sich keine Zellen aufgrund eines deutlich helleren Zytoplasmas oder einer elektronenoptisch auffälligen Granulierung als Calcitonin-Zellen erkennen (SRIVASTAV u. SWARUP 1982). Allerdings muß bei der Diskussion meiner Ergebnisse auch die Spezifität des Antiserums berücksichtigt werden. Calcitonin-Antikörper, die speziell gegen Vogelcalcitonin gerichtet sind, können weder über den Handel bezogen, noch im eigenen Institut hergestellt werden. Die verwendeten Primärantikörper wurden durch wiederholte intradermale Injektion synthetischen Humancalcitonins von Kaninchen gewonnen (MILAB-INFORMATION).

Das Peptidhormon Calcitonin besteht bei verschiedenen Tierarten - einschließlich des Menschen - übereinstimmend aus 32 Aminosäuren mit einer Disulfidbrücke zwischen Cystein-Resten der Positionen 1 und 7. Die

vergleichende Betrachtung der Hormonstruktur bei Mensch, Paarhufern und Fischen offenbart starke Unterschiede in der Aminosäuresequenz. Bestimmte Aminosäuren sind jedoch bei allen Tierarten identisch, dies gilt für die Positionen 1, 3 bis 7, 9, 28 und 32 (ZIEGLER 1981). Das Rattencalcitonin weicht nur in zwei Positionen von dem des Menschen ab (RAULAIS et al. 1976). Erwartungsgemäß reagieren auch die C-Zellen der Rattenschilddrüse positiv. Obwohl die Aminosäuresequenz des Vogelcalcitonins noch nicht feststeht, weist sein chromatographisches Profil auf Ähnlichkeiten mit Lachscalcitonin hin (WENTWORTH u. RINGER 1986). Dieses unterscheidet sich vom menschlichen Calcitonin immerhin in 14 Aminosäuren (ZIEGLER 1981). Die immunologische Kreuzreaktion zwischen einem Extrakt aus Ultimobranchialkörpern vom Huhn und einem Antiserum gegen Lachscalcitonin einerseits und die Prüfung auf Kreuzreaktion des Extraktes mit Antisera gegen Menschen- und Schweinecalcitonin andererseits deckt immunochemische Gleichheit von Hühner- und Lachscalcitonin auf. Gegen Menschen- und Schweineantisera kommt es mit Hühnercalcitonin zu keiner oder nur zu einer schwachen Kreuzreaktion (CUTLER et al. 1974). Inkubiert man Schnitte von Ultimobranchialkörpern, die mit Bouin'scher Lösung fixiert worden sind und von erwachsenen Hühnern stammen, mit Antikörpern gegen Schweinecalcitonin, führt dies zu einer intensiven Reaktion mit den im Gewebe vorliegenden C-Zellen (KAMEDA 1984). Bemerkenswert erscheint dabei, daß sich Schweinecalcitonin von Lachscalcitonin sogar in 17 Aminosäuren unterscheidet (ZIEGLER 1981). Würde man die Eignung der Antikörper gegen das Peptidhormon nur von seiner möglichst adäquaten Aminosäuresequenz abhängig machen, müßte Antiserum gegen menschliches Calcitonin bessere Reaktionen an Hühnerultimobranchialkörpern liefern, was aber nicht den Tatsachen entspricht (KAMEDA 1984). Ob nun die gesamte Aminosäuresequenz für den immunhistochemischen Nachweis calcitoninhaltiger Zellen die allein entscheidende Rolle spielt,

muß demnach dahingestellt bleiben.

Die Befunde der elektronenmikroskopischen Untersuchungen bestätigen, daß es sich beim vorliegenden Organmaterial um inaktives Schilddrüsengewebe handelt. Abgesehen von der niedrigen Zellhöhe zeigt die geringe Anzahl von Mikrovilli der apikalen Zellmembranen den schwachen Aktivitätsgrad der Drüse an (FRENCH u. HODGES 1977). Ferner sind Endothelzellen mit vielen Pinozytosevesikeln vor allem hochprismatischen, also aktiven Epithelzellen benachbart (BESTETTI et al. 1977). Bei der Wachtelschilddrüse können jedoch keine Vesikel im Endothel festgestellt werden. Dies ist bisher nur bei TSH-vorbehandelten Hühnern (FUJITA 1963) und bei normalen Hähnen (FRENCH u. HODGES 1977) beobachtet worden.

An den Endothelzellen des Schilddrüsengewebes der japanischen Wachtel kommen kleine Zytoplasmafortsätze vor, die frei ins Lumen hineinragen. Eine Brücken- oder Taschenbildung dieser Gebilde (BESTETTI et al. 1977) ist nicht erkennbar.

FRENCH u. HODGES (1977) beschreiben beim Huhn Kontaktstellen benachbarter Follikelkephelzellen nur für den apikalen Zellbereich. Das Follikelkephel der japanischen Wachtel weist ebenfalls nur apikal "tight junctions" und "intermediary junctions" auf. Das Fehlen von Desmosomen gilt für die Vogelschilddrüse als charakteristisch (MURAMOTO 1964, FRENCH u. HODGES 1977). Dies trifft auch, was meine Untersuchungen zeigen, für die Wachtel zu.

Die unterschiedlichen Vesikel, die bevorzugt im mittleren und apikalen Zellbereich in Erscheinung treten, sind bisher nur von FRENCH u. HODGES (1977) benannt und funktionell eingeordnet worden. Da am eigenen Untersuchungsmaterial keine Sekretions- oder Resorptionsvorgänge beobachtet werden konnten, erscheint es zu gewagt, eine eigenständige Benennung dieser Körper nur in Anbetracht ihrer Größe und ihrer

Elektronendichte vorzunehmen.

BENSLEY (1914) und BARGMANN (1939) beschreiben erstmals Kristalloide in den Schilddrüsenzellen des Opossums. Diese rutenartigen Strukturen sind weder unter dem Lichtmikroskop mit der PAS- oder Eosinfärbung, wie sie von YOSHIMURA u. IRIE (1961) beim Huhn und von VELICKY et al. (1977) beim Fasan dargestellt werden, noch elektronenmikroskopisch am eigenen Untersuchungsmaterial zu sehen. Das mag daran liegen, daß nach YOSHIMURA u. IRIE (1961) die elektronenoptische Darstellung dieser Gebilde ohnehin nur an Schilddrüsen von Tieren erfolgen kann, denen zum Zwecke der Kristalloidvermehrung zuvor Oxytocin oder Dikarbamat injiziert worden ist.

6. Zusammenfassung

Bei 20 adulten japanischen Wachteln (*Coturnix coturnix japonica*) wurde die Morphologie der Schilddrüse licht- und elektronenmikroskopisch untersucht.

Paraffinschnitte von Bouin-fixierten Organen und Semidünnschnitte von perfusionsfixiertem Material zeigten, daß die Wachtelthyroidea in ihrer Struktur mit den Beschreibungen von Schilddrüsen anderer Vogelarten weitgehend übereinstimmt. Der zweischichtige Aufbau der Bindegewebskapsel wurde erstmals erwähnt. Angaben über die Aufteilung des Parenchyms in Läppchen durch unterschiedlich stark ausgeprägte interfollikuläre Bindegewebszüge konnten nicht bestätigt werden. Die Follikelgröße war nahezu einheitlich, Riesenfollikel waren nicht feststellbar. Das niedrige Follikelepithel ist als Ausdruck geringfügiger Drüsenaktivität zu werten.

Von 13 Lektinen, die mit Fluoreszein oder Peroxidase markiert waren, wiesen acht Lektine eine positive Reaktion im Schilddrüsengewebe auf und zwar CON A, DBA, MPA, PNA, RCA-I, RCA-II, UEA-I und WGA. Die positive Reaktion beschränkte sich auf die Follikelepithelzellen und auf das Bindegewebe.

Calcitonin-Zellen konnten in der Wachtelschilddrüse weder mittels immunhistochemischer Methodik noch elektronenmikroskopisch gefunden werden. Die elektronenmikroskopischen Befunde weichen von den Ergebnissen früherer Untersuchungen an der Vogelschilddrüse kaum ab.

Kristalline waren nicht feststellbar.

Summary

Histological, histochemical and ultrastructural Investigation of the Thyroid Gland of the Japanese Quail (*Coturnix coturnix japonica*)

The morphology of the thyroid glands from 20 adult japanese quails (*Coturnix coturnix japonica*) were studied using light- and electron-microscopical techniques.

Paraffin sections from Bouin-fixed organs and semi-thin sections revealed many similarities with the structure of thyroid glands from other birds. In the quail a two-layered connective tissue capsule exists. Information about parenchym division with interfollicular connective tissue trabeculae into lobules could not be confirmed. The diameter of the follicles was almost uniform; giant follicles were not seen. The follicular epithelium was flat, probably due to low glandular activity which was interpreted as a result of the condition.

13 Lectins, conjugated with fluorescein or peroxidase, were tested. Lectin binding sites for eight lectins (CON A, DBA, MPA, PNA, RCA-I, RCA-II, UEA-I and WGA) were detected. Positive reactions were restricted to the cells of the follicular epithelium and to the connective tissue.

Calcitonin containing cells in the thyroid of the quail could not be identified neither immunohistochemically nor electron microscopically.

7. Literaturverzeichnis

- ABDEL-MAGIED, E.M., u. A.S. KING (1978):
The topographical Anatomy and Blood Supply of the Carotid Body
Region of the Domestic Fowl.
J. Anat. 126, 535-546
- ANDERSEN, K. (1965):
Embryologie.
in: Medizin von heute, 5.
Tropon-Werke, Köln-Mülheim
- ARIMA, T., u. R.G. SPIRO (1972):
Studies on the Carbohydrate Units of Thyroglobulin.
J. Biol. Chem. 247, 1836-1848
- ASSENMACHER, J. (1973):
Thyroid Gland.
in: D.S. FARNER u. J.R. KING (Hrsg.): Avian Biology.
Academic Press, New York, London, Bd. 3, S. 211-236
- ASTIER, H. (1980):
Thyroid Gland in Birds: Structure and Function.
in: A. EPPLÉ u. M.H. STETSON (Hrsg.): Avian Endocrinology.
Academic Press, New York, London, S. 167-169
- BARGMANN, W. (1939):
Die Schilddrüse.
in: W. VON MÖLLENDORFF (Hrsg.): Handbuch der mikroskopischen
Anatomie des Menschen.
Springer-Verlag, Berlin, Bd. VI/2
zit. nach YOSHIMURA u. IRIE (1961)
- BARGMANN, W. (1977):
Histologie und Mikroskopische Anatomie des Menschen. 7. Aufl
Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- BAUMEL, J.J. (1975):
Aves Nervous System.
in: R. GETTY (Hrsg.): Sisson and Grossman's. The Anatomy of the
Domestic Animals.
Saunders, Philadelphia, Bd. 2

- BAUMEL, J.J. (1979):
 Nomina Anatomica Avium.
 Academic Press, London, New York
- BENSLEY, R.R. (1914):
 The Thyroid Gland of the Opossum.
 Anat. Rec. 8, 431-443
- BESTETTI, G., M.G. CANESE u. G.L. ROSSI (1977):
 The Ultrastructure of the Blood Capillary Endothelium in the
 Thyroid Gland of the Domestic Fowl.
 J. Submicrosc. Cytol. 9, 23-30
- BLÄHSER, S., u. G. KRAUS (1972):
 Methode zur Darstellung der histologischen Funktionsbilder von
 Thyreozyten und Calcitoninzellen in der Rattenschilddrüse.
 Mikroskopie 28, 288-291
- BLÄHSER, S. (1978):
 Immunocytochemical Demonstration of Calcitonin-containing
 C-Cells in the Thyroid Gland of different Mammals.
 Cell Tissue Res. 186, 551-558
- BOYD, W.C., u. R.M. REGUERA (1949):
 Hemagglutinating Substances for human Cells in various Plants.
 J. Immunol. 62, 333-339
- BOYD, W.C., u. E. SHAPLEIGH (1954):
 Antigenic Relations of Blood Group Antigens as suggested by
 Tests with Lectins.
 J. Immunol. 73, 226-231
- BRETTON, R., u. J. BARIETY (1976):
 A comparative ultrastructural Localization of Concanavalin A,
 Wheat Germ and Ricinus Communis on Glomeruli of normal Rat
 Kidney.
 J. Histochem. Cytochem. 24, 1093-1100
- BROWN, J.C., u. R.C. HUNT (1978):
 Lectins.
 Int. Rev. Cytol. 52, 277

- CHRISTENSEN, V.L., H.V. BIELLIER u. J.F. FORWARD (1982):
 Physiology of Turkey Embryos during Pipping and Hatching.
 III. Thyroid Function.
 Poultry Sci. 61, 367-374
- COHEN, D.H., A.M. SCHNALL, R.L. MACDONALD u. L.H. PITTS (1970):
 Medullary Cells of Origin of vagal cardioinhibitory Fibres in the
 Pigeon. I. Anatomical Studies of peripheral Vagus Nerve and the
 dorsal motor Nucleus.
 J. Comp. Neurol. 140, 299-320
- CUTLER, G.B., J.F. HABENER, P.C. DEE u. J.T. POTTS (1974):
 Radioimmunoassay for Chicken Calcitonin.
 FEBS Lett. 38, 209-212
- DECUYPERE, E., E.J. NOUWEN, E.R. KUHN, R. GEERS u. H. MICHELS (1979):
 Iodohormones in the Serum of Chick Embryos and post-hatching
 Chickens as influenced by Incubating Temperature. Relationship
 with Hatching Process and Thermogenesis.
 Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys. 19, 1713
 zit. nach WENTWORTH u. RINGER (1986)
- DUDLEY, J. (1942):
 The Development of the Ultimobranchial Body of the Fowl, Gallus
 Domesticus.
 Am. J. Anat. 71, 65-88
- DULBECCO, R., u. M. VOGT (1954):
 Plaque Formation and Isolation of pure Lines with Poliomyelitis
 Viruses.
 J. Exp. Med. 99, 167-182
- EICKHOFF, W. (1965):
 Die Schilddrüse. Morphologie , Funktion und Klinik.
 Johann Ambrosius Barth, München
- EHRlich, P. (1891):
 Dtsch. Tierärztl. Wochenschr. 17, 976-979, 1218-1219
 zit. nach GOLDSTEIN u. HAYES (1978)
- EHRlich, P. (1897):
 Fortschr. Med. 15, 41-43
 zit. nach GOLDSTEIN u. HAYES (1978)

- EMURA, S., I. ISOGAI u. H. TRAN-LAM (1977):
Ultrastructure of Quail Thyroid Gland.
Jpn. Poultry Sci. 14, 120-130
- FEDER, F.-H. (1971):
Zur Topographie und mikroskopischen Anatomie der endokrinen
Organe beim Wellensittich (*Melopsittacus undulatus*).
Anat. Anz. 128, 338-353
- FITZGERALD, T.C. (1969):
The Coturnix Quail, Anatomy and Histology.
The Iowa State University Press, Ames, Iowa
- FOLLET, B.K., u. J. RILEY (1967):
Effect of the Length of the daily Photoperiod of Thyroid Activity
in the female Japanese Quail (*Coturnix coturnix japonica*).
J. Endocrinol. 39, 615
- FORSYTH, D. (1908):
The comparative Anatomy, gross and minute, of the Thyroid and
Parathyroid Glands in Mammals and Birds.
J. Anat. Physiol. 42, 302-316
- FRENCH, E.J., u. R.D. HODGES (1977):
Fine structural Studies on the Thyroid Gland of the normal
Domestic Fowl.
Cell Tissue Res. 178, 397-410
- FREY, H., u. E.V. FLOCK (1958):
The Production of Thyroid Hormone in the day-old Chick, with
Notes on the Effect of Thyrotropin on the Chick Thyroid.
Acta Endocrinol. 29, 550-560
- FRITSCHI, E. (1926):
Beitrag zur Strumafrage beim Huhn.
Virchows Arch. Abt. A Pathol. Anat. 260, 421-435
- FWJITA, H. (1963):
Electron Microscopic Studies on the Thyroid Gland of Domestic
Fowl, with special Reference to the Mode of Secretion and the
Occurrence of a central Flagellum in the Follicular Cell.
Z. Zellforsch. 60, 615-632

FUJITA, H. (1975):

Fine Structure of the Thyroid Gland.

Int. Rev. Cytol. 40, 197-280

GALLAGHER, J.T. (1984):

Carbohydrate-Binding Properties of Lectins: A possible Approach to Lectin Nomenclature and Classification.

Biosci. Rep. 4, 621-623

GOLDSTEIN, I.J., u. C. HAYES (1978):

The Lectins: Carbohydrate-Binding Proteins of Plants and Animals. in: S. TIPSON u. T. HORTON (Hrsg.): Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry.

Academic Press, New York, San Francisco, Vol. 35, S. 137-340

GOLDSTEIN, I.J. (1980):

Lectins: Their Nature and Application.

Qualityline, Research Product Division, MILES Laboratories, INC

GOLDSTEIN, I.J. (1981):

Lectins: An Overview.

in: Biotechs, E.Y. Laboratories, San Mateo, USA

GONZALEZ-CAMPORA, R., C. MONTERO, I. MARTIN-LACAVE u. H. GALERA (1986):

Demonstration of Vascular Endothelium in Thyroid Carcinomas using *Ulex europaeus* I Agglutinin.

Histopathology 10, 261-266

GRANDHI, R.R., u. R.G. BROWN (1975):

Age-related Changes in Thyroid Hormone Synthesis and circulating Thyroid Hormone Levels.

Poultry Sci. 54, 488-493

HACHMEISTER, U., J. KRACHT, H. KRUSE u. M. LENKE (1967):

Lokalisation von C-Zellen im Ultimobranchialkörper des Haushuhns.

Naturwissenschaften 54, 619

HAMMERSEN, F. (1985):

Histologie, Farbatlas der Mikroskopischen Anatomie. 3. Aufl.

Urban und Schwarzenberg, München, Wien

HANSBOROUGH, L.A., u. M. KHAN (1951):

The initial Function of the Chick Thyroid Gland with the Use of Radioiodine ¹³¹I.

J. Exp. Zool. 116, 447-453

HARACH, H.R. (1985):

Thyroid Follicles with Acid Mucins in Man: A second Kind of Follicles ?

Cell Tissue Res. 242, 211-215

HELLIN, H. (1891):

Der giftige Eiweißkörper Abrin und dessen Wirkung auf das Blut.
Diss., Dorpat

HENDRICH, C.E., u. C.W. TURNER (1964):

Estimation of Thyroid Stimulating Hormone (TSH) Secretion Rates of New Hampshire Fowls.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 117, 218

zit. nach WENTWORTH u. RINGER (1986)

HILFER, S.R. (1979):

Follicle Formation in the Embryonic Chick Thyroid. III. Initiation of Follicle Formation.

Tissue Cell 11, 727-740

HODGES, R.D. (1981):

Endocrine Glands.

in: A.S. KING u. J. MCLELLAND (Hrsg.): Form and Function in Birds.

Academic Press, New York, London, Vol. 2, S. 149-160

HOLTHÖFER, H., I. VIRTANEN, A.-L. KARINIEMI, M. HORMIA, E. LINDER u. A. MIETTINEN (1982):

Ulex europaeus I Lectin as a Marker for Vascular Endothelium in Human Tissues.

Lab. Invest. 47, 60-66

HOSHINO, T., u. N. UI (1970):

Comparative Studies on the Properties of Thyroglobulins from various Animal Species.

Endocrinol. Jpn. 17, 521-533

JUNQUEIRA, L.C., u. J. CARNEIRO (1986):

Histologie

Springer-Verlag, New York, Berlin

- ITO, T., Y. TAKAHASHI u. K. KOBAYASHI (1964):
Über die Parafollikulärzellen in der Schilddrüse von einem
Nyctereutes Procyonoides viverrinus.
Arch. histol. jpn. 24, 113-127
- KAMEDA, Y. (1968):
Parafollicular Cells of the Thyroid as studied with Davenports
Silver Impregnation.
Arch. histol. jpn. 30, 83-94
- KAMEDA, Y. (1984):
Ontogeny of Chicken Ultimobranchial Glands studied by an
Immunoperoxidase Method using Calcitonin, Somatostatin and 19
S-Thyroglobulin Antisera.
Anat. Embryol. 170, 139-144
- KANEMATSU, S., u. S. MIKAMI (1970):
Effects on Hypothalamic Lesions on the Pituitary-Thyroid System
in the Chicken.
Jpn. J. Zootech. Sci. 37, 28
zit. nach WENTWORTH u. RINGER (1986)
- KING, A.S., u. J. MCLELLAND (1984):
Thyroid Glands.
in: Birds, Their Structure and Function. 2. Aufl.
Bailliere Tindall, London, Philadelphia, S. 204-206
- KOCH, O., u. G. UHLENBRUCK (1982):
From "invertebrate" to "in vertebrate" Lectins: A Review.
in: Biotechs, E.Y. Laboratories, INC, San Mateo, USA
- KOCOUREK, J., u. V. HOREJSI (1983):
A Note of the recurrent Discussion on Definition of the Term
"Lectin".
in: T.C. BOG-HANSEN u. G.A. SPENGLER (Hrsg.): Lectins. Biology,
Biochemistry, Clinical Biochemistry.
de Gruyter, Berlin, New York, Vol. 3, S. 3-6
- KRAINTZ, L., u. E.A. PUILL (1967):
Absence of hypocalcemic Activity in Chicken Thyroid.
Can. J. Physiol. Pharmacol. 45, 1099

KÜCHLER, W. (1935):

Jahreszeitliche Veränderungen im histologischen Bau der Vogelschilddrüse.

J. für Ornithologie, S. 414

zit. nach RAETHER (1964)

KUROSUMI, K. (1961):

Electron Microscopic Analysis of the Secretion Mechanism.

Int. Rev. Cytol. 2, 1-124

LAGUE, P.C., u. A. VAN TIENHOVEN (1969):

Comparison between Chicken and Guinea Pig Thyroid with Respect to the Incorporation of ^{131}I in vitro.

Gen. Comp. Endocrinol. 12, 305-312

LANDSTEINER, K., u. H. RAUBITSCHKE (1908):

Beobachtungen zur Hämolyse und zur Hämagglutination.

Zbl. Bakt. I. Abt. 45, 660-667

LANDSTEINER, K. (1962):

The Specificity of Serological Reactions.

Dover Publications, New York

LEATHEM, A., u. N. ATKINS (1983):

Lectin Binding to formalin-fixed Paraffin Sections.

J. Clin. Pathol. 36, 747-750

LE DOUARIN, N., J. FONTAINE u. C. LE LIEVRE (1974):

New Studies on the Neural Crest Origin of the Avian Ultimobranchial Glandular Cells - Interspecific Combinations on Cytochemical Characterization of C Cells based on the Uptake of Biogenic Amine Precursors.

Histochemistry 38, 297-305

LIENER, I.E., N. SHARON u. I.J. GOLDSTEIN (1986):

The Lectins. Properties, Functions and Applications in Biology and Medicine.

Academic Press, New York, London

MAKITA, T., T. SHIODA u. S. NISHIDA (1966):

A histological Study on the Innervation of the Avian Thyroid Gland.

Arch. histol. jpn. 26, 203-213

MALINOVSKY, L. (1962):

Contribution on the Anatomy of the Vegetative Nervous System in the Neck and Thorax of the Domestic Pigeon.

Acta anat. 50, 326-347

MARTIN, D.W. (1986):

Membranen.

in: H.A. HARPER, D.W. MARTIN, P.A. MAYES u. V.W. RODWELL (Hrsg.): Medizinische Biochemie.

Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg

MATHEWS, W.W. (1972):

Atlas of Descriptive Embryology.

The Macmillan Company New York, Collier-Macmillan Ltd. London

MATTHEWS, E.W., J.M. MOSELEY, R.H. BREED, T.V. GUDMUNDSSON, P.G.H.

BYFIELD, L. GALANTE, A. TSE u. I. MACINTYRE (1968):

Ultimobranchial and Thyroid Calcitonin.

in: R.V. TALMAGE u. L.F. BELANGER (Hrsg.): Parathyroid Hormone and Thyrocalcitonin (Calcitonin).

Excerpta medica foundation, Amsterdam, S. 68-73

MCFARLAND, L.Z., M.R. YOUSEF u. W.O. WILSON (1966):

The Influence of ambient Temperature and Hypothalamic Lesions on the Disappearance Rate of Thyroxine ^{131}I in the Japanese Quail.

Life Sci. 5, 309-315

MCNABB, F.M.A., R.T. WEIRICH u. R.A. MCNABB (1981):

Thyroid Function in embryonic and perinatal Japanese Quail.

Gen. Comp. Endocrinol. 43, 218-226

MESS, B., u. K. STRAZNICKY (1970):

Dynamics of Ribonucleic Acid (RNA) Synthesis in the Thyroid Epithelial Cells of normal and decapitated Chicken Embryos.

Acta Biol. Acad. Sci. Hung. 21, 115-119

MIKAMI, S., u. S. MIYASAKA (1983):

Vascularization and its fine Structure of the Thyroid Gland of Japanese Quail. *Coturnix coturnix japonica*.

J. Fac. Agric. 16, 81-91

MILAB:

Antiserum to Calcitonin.

Box 20047, S-200 74 Malmö, Sweden

- MUELLER, W.J., u. A.A. AMEZCUA (1959):
 The Relationship between certain Thyroid Characteristics of
 Pullets and their Egg Production, Body Weight and Environment.
 Poultry Sci. 38, 620
 zit. nach WENTWORTH u. RINGER (1986)
- MURAMOTO, K. (1964):
 Okajiamas Folia Anatomica Japonica 39, 321
 zit. nach ASTIER (1980)
- NODEN, D.M., u. A. DE LAHUNTA (1985):
 The Embryology of Domestic Animals.
 Williams and Wilkins, Baltimore, London
- OISHI, T., u. T. KONISHI (1978):
 Effects of Photoperiod and Temperature on Testicular and Thyroid
 Activity of Japanese Quail.
 Gen. Comp. Endocrinol. 36, 250-254
- PATTEN, B.M., u. B.M. CARLSON (1974):
 Foundations of Embryology. 3. Aufl.
 McGraw-Hill Book Company, New York, St. Louis
- PAYNE, F. (1957):
 A cytological Study of the Thyroid Glands of normal and
 experimental Fowl, including Interrelationships with the
 Pituitary, Gonads and Adrenals.
 J. Morphol. 101, 89-129
- Petko, M. (1974):
 The Use of 1:9-Dimethyl-Methylene Blue for the Demonstration of
 Thyroid C Cells.
 Stain Technol. 49, 65-67
- PLENDL, J., u. W. SCHMAHL (1986):
 Die spezifische Darstellbarkeit von Blutgefäßen der NMRI-Maus
 während der Organogenese mit Dolichos biflorus-Agglutinin.
 Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung mbH München,
 Bericht 17

RAETHER, W. (1964):

Schilddrüse, Epithelkörperchen, ultimobranchialer Körper und Paraganglion caroticum, ihre Topographie, Blutversorgung und Morphologie bei Huhn, Taube, Gans und Ente.
Diss., Gießen

RAULAIS, D., J. HAGAMANN, D.A. ONTJES, R.L. LUNDBLAD u. H.S. KINGDON (1976):

The complete Amino-Acid Sequence of Rat Thyrocalcitonin.
Eur. J. Biochem. 64, 607-611

REFETOFF, S., N.J. ROBIN u. V.S. FANG (1970):

Parameters of Thyroid Function in Serum of 16 selected vertebrate Species: Study of PBI, Serum T_4 , free T_4 and the Pattern of T_4 and T_3 Binding to Serum Proteins.
Endocrinology 86, 793-805

REUTTER, W. (1984):

Glykokonjugate der Zelloberfläche als Informationsträger.
Verh. Ges. dt. Naturforscher u. Ärzte 113, 371-380

RINGER, R. K. (1976):

Thyroids.
in: P.D. STURKIE (Hrsg.): Avian Physiology. 3. Aufl.
Springer-Verlag, New York, Berlin

ROGLER, J.C., H.E. PARKER, F.N. ANDREWS u. C.W. CARRICK (1959):

The Effect of an Iodine Deficiency on Embryo Development and Hatchability.
Poultry Sci. 38, 398
zit. nach WENTWORTH u. RINGER (1986)

ROMANOFF, A.L. (1960):

The Avian Embryo.
The Macmillan Company, New York

ROMEIS, B. (1968):

Mikroskopische Technik. 16. Aufl.
R. Oldenbourg Verlag, München, Wien

ROTH, J. (1978):

The Lectins. Experimentelle Pathologie, Suppl.3
VEB Gustav Fischer Verlag, Jena

- SAWICKI, B., u. K. BAJKO (1974):
Introduction of Double Impregnation in the Method of Grimelius.
Folia Morphol. (Warsaw) 33, 45-51
- SANDUSKY, G.E., u. K.A. WIGHTMAN (1985):
Application of the Peroxidase-Antiperoxidase Procedure to the
Localization of Pituitary Hormones and Calcitonin in various
Domestic Animals and Human Beings.
Am. J. Vet. Res. 46, 739-741
- SCHESCHIN, J. (1925):
Beitrag zur Histologie der Vogelschilddrüse.
Diss., Wien
- SCHWECHHEIMER, K., G. WEISS, P. SCHNABEL u. P. MÖLLER (1984):
Lectin Target Cells in Human CNS and the Pituitary Gland.
Histochemistry 80, 165-169
- SHARON, N., u. H. LIS (1972):
Lectins: cell-agglutinating and sugar-specific Proteins.
Science 177, 949-958
- SHARON, N. (1977):
Lectins.
Sci. Am. 236, 108-117
- SHARON, N. (1982):
Lectins: Use for Cell Separation.
in: Biotechs, E.Y. Laboratories, INC, San Mateo, USA
- SNAPIR, N., B. ROBINSON, Y. HOFFMANN u. A. BERMANN (1982):
Adenohypophyseal Cytology of chemically and surgically thyroid-
ectomized Cockerels.
Poultry Sci. 61, 1720-1728
- SOBRINHO-SIMÕES, M., u. J. DAMJANOV (1986):
Lectin Histochemistry of Papillary and Follicular Carcinoma of
the Thyroid Gland.
Arch. Pathol. Lab. Med. 110, 722-729

- SOLCIA, E., G. VASSALLO u. C. CAPELLA (1968):
 Selective Staining of Endocrine Cells by basic Dyes after acid Hydrolysis.
 Stain Technol. 43, 257-263
- SOLCIA, E., C. CAPELLA u. G. VASSALLO (1969):
 Lead-Haematoxylin as a Stain for Endocrine Cells.
 Histochemistry 20, 116-126
- SORIMACHI, K., u. N. UI (1974):
 Comparison of the Iodoamino Acid Distribution in Thyroglobulins obtained from various Animal Species.
 Gen. Comp. Endocrinol. 24, 38-43
- SPIERS, D.E. (1980):
 The Development of Thermoregulation in the Bobwhite Quail.
 Ph. D. Thesis, Michigan State University, East Lansing, 270 p.
 zit. nach WENTWORTH u. RINGER (1986)
- SPIRO, R.G. (1965):
 The Carbohydrate Units of Thyroglobulin.
 J. Biol. Chem. 240, 1603-1610
- SPIRO, R.G., u. M.J. SPIRO (1965):
 The Carbohydrate Composition of the Thyroglobulins from several Species.
 J. Biol. Chem. 240, 997-1001
- SPIRO, R.G., u. M. J. SPIRO (1966):
 Glycoprotein Biosynthesis: Studies on Thyroglobulin.
 J. Biol. Chem. 241, 1271-1282
- SRIVASTAV, A.K., u. K. SWARUP (1982):
 Thyroid Calcitonin Cells and unusual Follicles in the Fox.
 Acta anat. 112, 338-345
- SSINELNIKOW, R. (1928):
 Die Herznerven der Vögel.
 Zeitschrift für Anatomie und Entwicklungsgeschichte 86, 540-562

- STEPHENSON, T.J., D.W.R. GRIFFITHS u. P.M. MILLS (1986):
Comparison of *Ulex europaeus* I Lectin Binding and Factor VIII-related Antigen as Markers for Vascular Endothelium in Follicular Carcinoma of the Thyroid.
Histopathology 10, 251-260
- STILLMARK, H. (1888):
Über Ricin, ein giftiges Ferment aus dem Samen von *Ricinus communis* L. und einigen anderen Euphorbiaceen.
Diss., Dorpat
- STOECKEL, M.E., u. A. PORTE (1969):
A comparative Electron Microscopic Study on the Fowl, the Pigeon and the Turtle-Dove of the C Cells localized in the Ultimobranchial Body and the Thyroid.
in: S. TAYLOR (Hrsg.): *Calcitonin, Proceedings of the Second International Symposium*, S. 327-338
William Heinemann Medical Books, London
- STOLL, R., u. P. BLANQUET (1953):
Sur l'activité des thyroïdes de l'embryon du poulet, provenant d'œufs "marqués" par l'administration de ^{131}I à la poule.
Ann. Endocrinol. (Paris) 14, 1
zit. nach WENTWORTH u. RINGER (1986)
- STUX, M., B. THOMPSON, H. ISLER u. C.P. LEBLOND (1961):
The "light Cell" of Thyroid Gland in the Rat.
Endocrinology 68, 292-308
- TATA, J.R., u. C.A. SHELLABARGER (1959):
An Explanation of the Difference between the Response of Mammals and Birds to Thyroxine and Triiodothyronine.
Biochem. J. 72, 608-613
- THOSS, K., u. J. ROTH (1975):
The Use of Fluorescein Isothiocyanate-labelled Lectins for immunohistochemical Demonstration of Saccharides.
Exp. Pathol. 10, 258-267
- TSUCHIYA, T., Y. SHIOMURA, K. SUZUKI, H. NAGAI u. H. TAMATE (1984):
Immunocytochemical Study on the C Cells in Pig Thyroid Glands.
Acta anat. 120, 138-141

TSUTSUI, C. (1958):

Studies on the Thyroid Follicles.

Igaku Kenkyu 28, 249-278

VAN HEYNINGEN, H.E. (1965):

Correlated Light and Electron Microscope Observations on Glykoprotein-containing Globules in the Follicular Cells of the Thyroid Gland of the Rat.

J. Histochem. Cytochem. 13, 286-295

VARUTE, A.T., u. M.N. NALAWADE (1972):

Histochemical Analysis of Mucosubstances in Thyroid of Bat *Hipposideros speoris*: Correlation of Sialo- and neutral Mucins with functional State of Thyroid Follicles.

Histochem. Cytochem. 10, 125-136

VELICKY, J., M. TITLBACH, Z. RYCHTER u. L. HOSTYN (1977):

Light and Electron Microscopy Observations in the Thyroid Gland of the Pheasant (*Phasianus colchicus* L.)

Z. mikrosk.-anat. Forsch. 91, 460-474

VLIJM, L. (1958):

On the Production of Hormones in the Thyroid Gland of Birds (CockereIs).

Arch. Neerl. Zool. 12, 467

zit. nach WENTWORTH u. RINGER (1986)

VON MAYERSBACH (1976):

Grundriß der Histologie des Menschen. 2. Aufl.

Bd. 2: Spezielle Histologie

Gustav Fischer Verlag, Stuttgart

WATANABE, T (1960):

Comparative and Topographical Anatomy of the Fowl. VII. On the peripheral Course of the Vagus Nerve in the Fowl.

Jpn. J. Vet. Sci. 22, 145-154

WATANABE, M., T. MURAMATSU, H. SHIRANE u. K. UGAI (1981):

Discrete Distribution of Binding Sites for DBA and for PNA in Mouse Organ Tissues.

J. Histochem. Cytochem. 29, 779-790

- WATKINS, W.M., u. W.T.J. MORGAN (1952):
Neutralization of the Anti-H Agglutinin in Eel Serum by simple Sugars.
Nature 169, 825-826
- WENTWORTH, B.C., u. R.K. RINGER (1986):
Thyroids.
in: P.D. STURKIE (Hrsg.): Avian Physiology. 4. Aufl.
Springer-Verlag, New York, Berlin, S. 452-465
- WEST, K.P., H.A. PLATTS, A. FLETCHER u. F. WALKER (1982):
Tissue Carbohydrate Identification by the Use of Lectins.
J. Clin. Pathol. 35, 239-240
- WIESER, R., u. G. BRUNNER (1983):
Initiation of Contact Inhibition by substrate-bound Plasma Membrane Glycoproteins and Lectins in serum-free hormone-supplemented Cultures of GH₃ Cells.
Exp. Cell Res. 147, 23-30
- WIGHT, P.A.L. (1986):
Hemiogenesis of the Thyroid Gland in the Quail (*Coturnix coturnix japonica*).
J. Comp. Pathol. 96, 235-236
- WINQVIST, L., L. ERIKSSON, G. DALLNER u. B. ERSSON (1976):
Binding of Glycoproteins of Microsomal and Golgi Membranes to Lectins.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 68, 1020-1026
- WHUR, P., A. HERSCOVICS u. C.P. LEBLOND (1969):
Radioautographic Visualization of the Incorporation of Galactose-³H and Mannose-³H by Rat Thyroids in vitro in Relation to the Stages of Thyroglobulin Synthesis.
J. Cell Biol. 43, 289-311
- YOSHIMURA, F., u. M. IRIE (1961):
Licht- und elektronenmikroskopische Studie an den Kristalloiden in der Schilddrüse.
Z. Zellforsch. 55, 204-219

ZIEGLER, R. (1981):
Calcitonin.
Sandoz AG, Nürnberg

8. Anhang

Abbildungen 1-10: Lichtmikroskopische Aufnahmen

Abbildungen 11-14: Elektronenmikroskopische Aufnahmen

Tabelle 1: Aufstellung der verwendeten Lektine

Tabelle 2: Nachweis von Lektinbindungsstellen mit FITC-markierten
Lektinen

Tabelle 3: Nachweis von Lektinbindungsstellen mit HRP-markierten
Lektinen

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

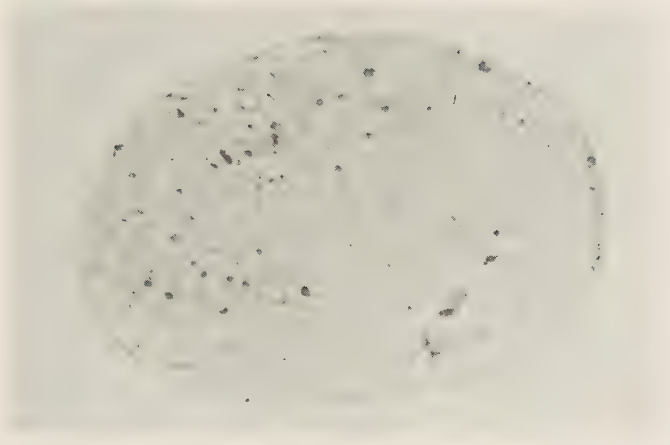


Abb. 1: H.E.-Färbung, Schilddrüse, Übersicht (x 32)

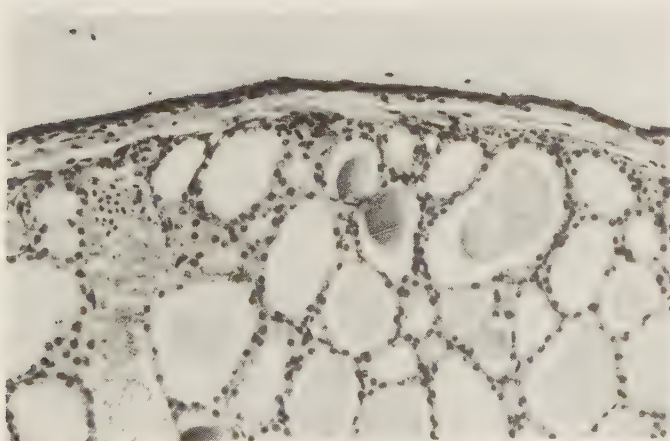


Abb. 2: H.E.-Färbung, Randbezirk der Schilddrüse mit zweischichtiger Bindegewebskapsel (x 320)



Abb 3 PAS-Färbung, zentraler Bereich der Schilddrüse (x 320)

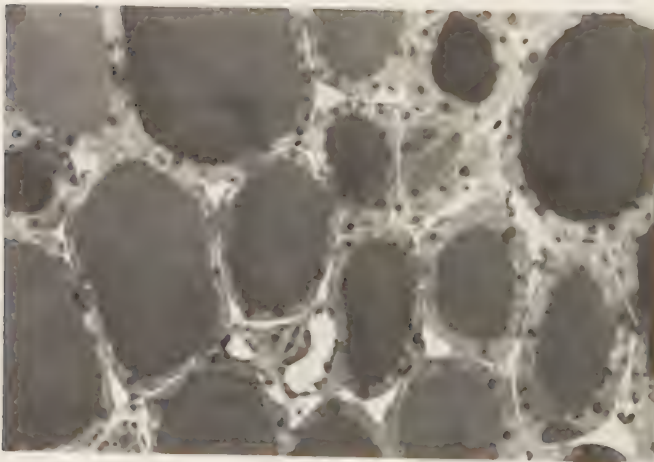


Abb 4 Semidunnschnitt, zentraler Bereich der Schilddrüse,
Vesikel im apikalen Zellbereich (x 512)

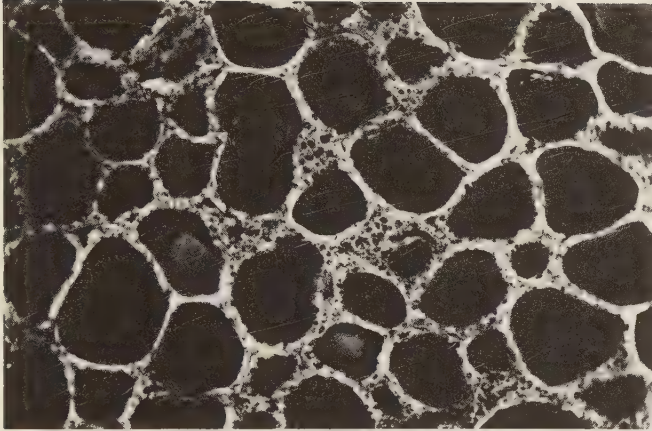


Abb. 5: Lektinbindungsstellen für FITC-markiertes CON A sind im gesamten Follikelzellplasma vorhanden. (x 320)

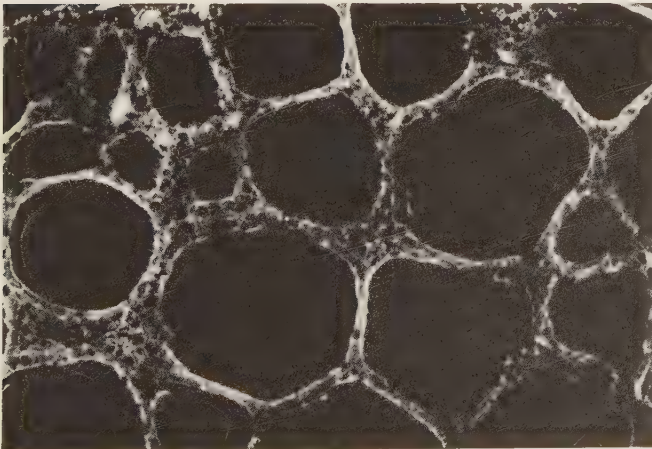


Abb. 6: Lektinbindungsstellen für FITC-markiertes WGA treten im apikalen Zellbereich auf. (x 320)

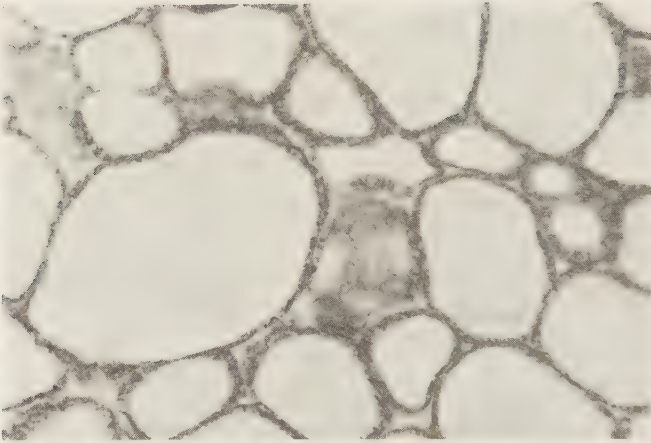


Abb. 7: Lektinbindungsstellen für HRP-markiertes CON A lassen sich im gesamten Follikelzellplasma feststellen. (x 320)

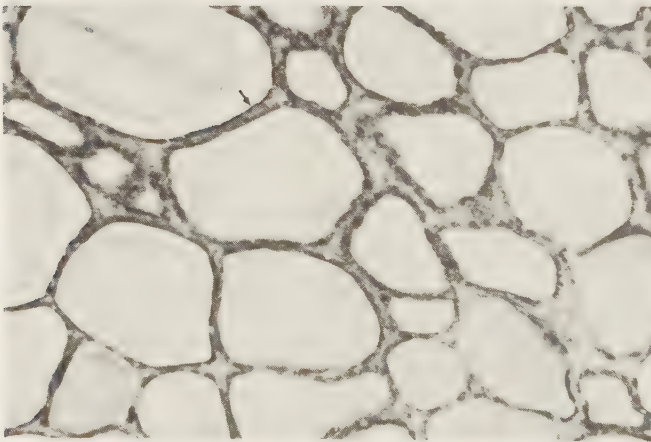


Abb. 8: Lektinbindungsstellen für HRP-markiertes WGA treten im apikalen Zellbereich auf. (x 320)



Abb. 9: Beim immunhistochemischen Nachweis von Calcitonin ist in der Schilddrüse der Wachtel keine positive Reaktion erkennbar. (x 320)

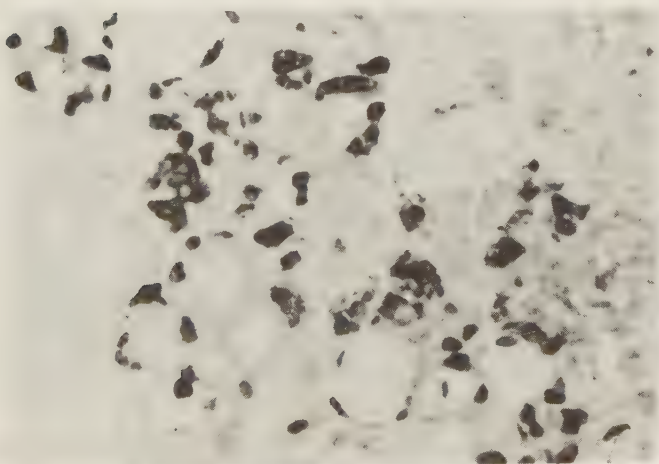


Abb. 10: Positivkontrolle, Rattenschilddrüse mit parafollikulär gelegenen C-Zellen (x 320)

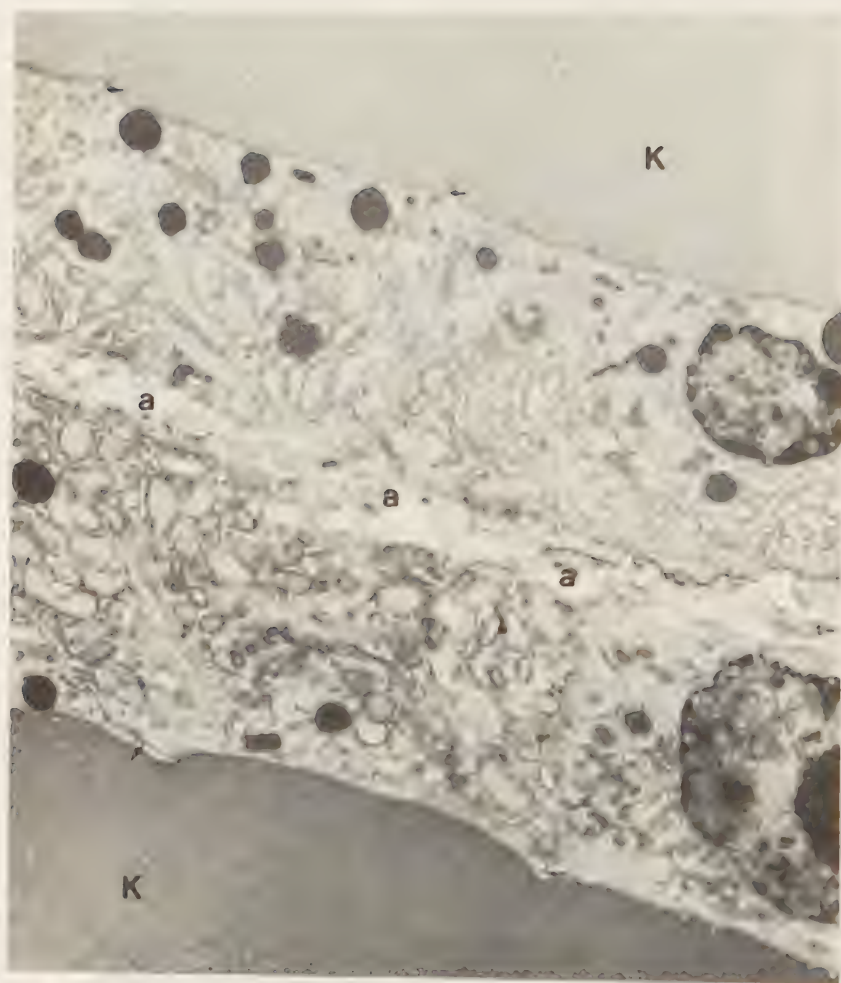


Abb. 11. Follikel­epithelzellen ane­inander­grenzen­der Schilddrüsen­follikel mit schma­lem inter­folliku­lärem Bin­de­ge­webe (a), Zell­kon­takt­stellen (→) und Kol­loid (K); (x 12000)



Abb. 12. Follikelzelle mit abgeflachtem Kern (nu) und gut ausgeprägter Basalmembran (—), stummelförmige Mikrovilli (mv) ragen ins Kolloid (K); (x 36000)

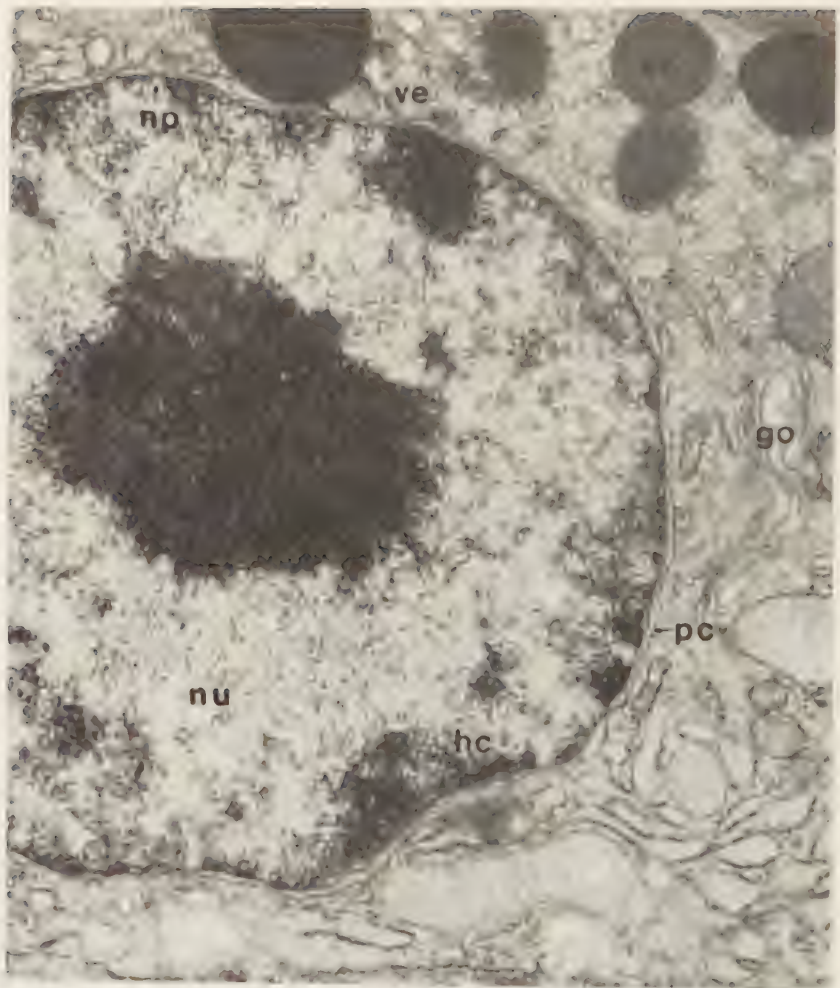


Abb 13 Follikelzelle mit rundem Kern (nu), Kernkörperchen (nuc), randständig verdichtetem Heterochromatin (hc), Kernporen (np), und perinukleären Zisternen (pc), Vesikel (ve) unterschiedlicher Größe und Dichte kommen bevorzugt im apikalen Zellbereich vor; paranuklear liegt ein undeutlich ausgeprägter Golgi-Apparat (go) (x 36000)



Abb 14 Follikelzelle bei paranukleärer Schnitfführung. Im Zytoplasma liegt ein gut ausgebildetes, rauhes endoplasmatisches Retikulum (rer) mit unregelmäßig weiten Zysten, dazwischen liegen Mitochondrien vom Crista-Typ (mi). Vakuolen (vc) mit verschiedenen Vesikelarten kommen im apikalen Zellbereich vor (x 36000)

Tabelle 1: Aufstellung der verwendeten Lektine

Lektin	Abk.	Spezifität	Marker
<u>Glukose/Mannose-Gruppe</u>			
Canavalia ensiformis	CON A	α -Man > α -Glc > α -GlcNAc	FITC/ HRP
<u>N-Acetylglukosamin-Gruppe</u>			
Griffonia simplicifolia II	GS-II	α - und β -GlcNAc	FITC
Ulex europaeus II	UEA-II	L-Fuc α -1,2Gal β -1,4GlcNAc	FITC/ HRP
Triticum vulgare	WGA	GlcNAc(β -1,4GlcNAc) ₁₋₂ > Neu5Ac	FITC/ HRP
<u>N-Acetylgalaktosamin/ Galaktose-Gruppe</u>			
Dolichos biflorus	DBA	GalNAc α -GalNAc >> α -GalNAc	FITC/ HRP
Griffonia simplicifolia I-A ₄	GS-I	α -GalNAc > α -Gal	FITC
Helix pomatia	HPA	GalNAc α -GalNAc > α -GalNAc	FITC
Maclura pomifera	MPA	α -GalNAc > α -Gal	FITC
Arachis hypogaea	PNA	Gal β -1,3GalNAc > α - und β -Gal	FITC/ HRP
Ricinus communis (agglutinin)	RCA-I	β -Gal > α -Gal >> GalNAc	FITC/ HRP
Ricinus communis (toxin)	RCA-II	β - und α -Gal > GalNAc	FITC/ HRP
Glycine max	SBA	α - und β -GalNAc > α - und β -Gal	FITC/ HRP
<u>L-Fucose-Gruppe</u>			
Ulex europaeus I	UEA-I	α -L-Fuc	FITC/ HRP

FITC-Lektin	Verd.: µg/ml	Follikelzpl.	Membranäquiv.	Kapselbgw.	Interf. Stroma
CON A	100	+++	-	-	-
	50	++	-	-	-
	20	+	-	-	-
MPA	100	++ (a)	++ (b) (c)	-	-
	50	+	+	-	-
	20	-	-	-	-
PNA	100	+	+	-	-
	50	-	-	-	-
	20	-	-	-	-
RCA I	100	+	++ (b) (c)	++	-
	50	-	+	+	-
	20	-	-	-	-
RCA II	100	+++ (a)	+++ (b)	+++	-
	50	++ (a)	++ (b)	++	-
	20	+	+	+	-
WGA	100	+++ (a)	+++	+++ (d)	-
	50	+++ (a)	+++	+++ (d)	-
	20	+++ (a)	+++	+++ (d)	-
WGA	10	++ (a)	++	++ (d)	-
	5	+	+	+	-
	2	-	-	-	-

Tabelle 2: Nachweis von Lektinbindungsstellen mit FITC-markierten Lektinen

Abkürzungen: Verd. = Verdünnung
 Follikelzpl. = Follikelzellplasma
 Membranäquiv. = Membranäquivalente
 Kapselbgw. = Kapselbindegewebe
 Interf. Stroma = interfollikuläres Stroma

(a) = paranukleär und supranukleär
 (b) = apikal
 (c) = nur vereinzelt
 (d) = nur peripher

HRP-Lektin	Verd.: µg/ml	Follikelzpl.	Membranäquiv.	Kapselbgw.	interf. Stroma
CON A	100	++	-	-	-
	50	+	-	-	-
	20	-	-	-	-
DBA	100	-	-	++ (d)	+
	50	-	-	+	(c)
	20	-	-	-	-
RCA I	100	+++ (a)	++ (b) (c)	+++	-
	50	++ (a)	+	++	-
	20	+	-	+	-
WGA	100	+++ (a)	++ (b) (c)	+++ (d)	-
	50	++ (a)	+	++ (d)	-
	20	+	-	+	-
UEA I	100	-	-	++	+
	50	-	-	+	(c)
	20	-	-	-	-

Tabelle 3: Nachweis von Lektinbindungsstellen mit HRP-markierten Lektinen

Abkürzungen: Verd. = Verdünnung
 Follikelzpl. = Follikelzellplasma
 Membranäquiv. = Membranäquivalente
 Kapselbgw. = Kapselbindegewebe
 interf. Stroma = interfollikuläres Stroma

(a) = paranukleär und supranukleär
 (b) = apikal
 (c) = nur vereinzelt
 (d) = nur peripher

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

CON A	Canavalia ensiformis
DBA	Dolichos biflorus Agglutinin
FITC	Fluoreszein-Isothiocyanat
Fuc	Fukose
Gal	Galaktose
GalNAc	N-Azetyl-Galaktosamin
Glc	Glukose
GlcNAc	N-Azetyl-Glukosamin
GS-I	Griffonia simplicifolia I
GS-II	Griffonia simplicifolia II
H.E.	Hämalaun-Eosin
HPA	Helix pomatia Agglutinin
HRP	horse-radish-peroxidase
Man	Mannose
MPA	Maclura pomifera Agglutinin
Neu5Ac	Azetyl-Neuraminsäure = Sialinsäure
PAP	Peroxidase-Antiperoxidase
PAS	periodic acid schiff
PBS	phosphate buffered saline
PNA	Arachis hypogea (peanut agglutinin)
RCA-I	Ricinus communis Agglutinin
RCA-II	Ricinus communis Toxin
TBS	triton buffered saline
UEA-I	Ulex europaeus I
UEA-II	Ulex europaeus II
WGA	Triticum vulgare (wheat germ agglutinin)

Danksagung

Für die Überlassung des Themas und für die Betreuung bei der Erstellung dieser Arbeit möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. F. Sinowatz sehr herzlich bedanken.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Tieranatomie II, insbesondere Frau M. Hoheisel, Herrn Dr. F. H. Feder, Herrn Dr. W. Amselgruber und Herrn M. Kosarian danke ich für ihre freundliche Beratung und Unterstützung.

Lebenslauf

Am 11. Juli 1960 kam ich in Nürnberg als zweites Kind des Studienrates Walter Kurt Raz und seiner Ehefrau, der Lehramtsassessorin Barbara Marie Beate, geborene Weishart, zur Welt. Ich bekenne mich zum römisch-katholischen Glauben. Die ersten sieben Jahre meines Lebens verbrachte ich in Sulzbach-Rosenberg, wo ich von 1966-1967 die katholische Knabenvolksschule besuchte. Wegen der Versetzung meines Vaters nach Viechtach, wo er die Leitung des neugegründeten Gymnasiums übernahm, wechselte ich an die Viechtacher Knabenvolksschule über. Nach dem vierten Pflichtschuljahr trat ich in das mathematisch-naturwissenschaftliche Gymnasium Viechtach ein. Nach neun Jahren - im Frühjahr 1979 - unterzog ich mich erfolgreich der Reifeprüfung.

Zum Wintersemester 1979/80 nahm ich das Studium der Tiermedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München auf. Dort absolvierte ich am 17. Januar 1985 erfolgreich die Tierärztliche Prüfung. Die Approbation als Tierarzt wurde mir am 22. Februar 1985 erteilt.

Zum 1. April 1985 erfolgte meine Einberufung zum Wehrdienst.

Nach meiner Entlassung am 30. Juni 1986 nahm ich nicht nur die Arbeit an der vorliegenden Dissertation auf, sondern war auch in der Gemeinschaftspraxis Dr. Ebner - Dr. Hiendl - Dr. Bullermann in Viechtach teilzeitbeschäftigt.

